

EXPRESSIONSANALYSE AUSGEWÄHLTER GENE DES JAK-STAT-SIGNALWEGES IN TROPHOBLASTZELLINIEN NACH STIMULATION MIT GM-CSF, LIF UND ONCOSTATIN M

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Juliane Beckus
geboren am 12.5.1989 in Reichenbach im Vogtland

Gutachter

1. Prof. Dr. Udo Markert, Jena
2. PD Dr. Uta-Christina Hipler, Jena
3. Prof. Dr. Udo Jeschke, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 8.2.2016

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
c	Konzentration
CASP	Caspase
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CIS	<i>Cytokine-Inducible SH2-containing protein</i>
cm ²	Quadratzentimeter
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase)
EVT	<i>Extravillous trophoblast</i> (extravillöse Trophoblastzellen)
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GP	Glycoprotein
FKS	Fetales Kälberserum
H6PD	Hexose-6-phosphat-Dehydrogenase
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
L	Leiter, Größenmarker in der Gelelektrophorese
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
mA	Milliampere

II

MMP	Matrix-Metalloproteinase
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
ng	Nanogramm
NTC	<i>Non-Template Control</i> (Negativkontrolle ohne <i>Template</i>)
Oligo(dT)s	Oligonukleotid aus Desoxribonukleotiden mit der Base Thymidin
P	Passage
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
qPCR	Quantitative PCR
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signalling</i>
SSI-1	<i>STAT-induced STAT inhibitor-1</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases</i>
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>Units</i> (Enzymeinheit)
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
μM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Plazentaentwicklung	2
2.2	Zelluläre und molekulare Mechanismen der Trophoblastinvasion.....	5
2.3	Plazentafehlentwicklung und maligne Trophoblasten.....	8
2.4	Die IL-6-Zytokinfamilie	9
2.4.1	LIF	9
2.4.2	Oncostatin M	10
2.5	Das Zytokin GM-CSF	11
2.6	Der JAK-STAT-Signalweg	13
2.7	Regulation des JAK-STAT-Signalweges in Trophoblasten	16
3	Ziel der Arbeit	18
4	Material und Methoden	20
4.1	Material	20
4.1.1	Geräte	20
4.1.2	Chemikalien	20
4.1.3	Kits	22
4.1.4	Enzyme	22
4.1.5	Lösungen	22
4.1.6	Primer.....	26
4.1.7	Zelllinien	26
4.2	Methoden	27
4.2.1	Zellkultur.....	27
4.2.2	Zellstimulation mit Zytokinen	28
4.2.3	Entwicklung neuer Primer	28
4.2.4	Extraktion der Gesamt-RNA.....	29
4.2.5	Extraktion der genomischen DNA	29
4.2.6	Reverse Transkription	29
4.2.7	Konventionelle Polymerasekettenreaktion	29
4.2.8	<i>Low-volume-RT-PCR</i>	30
4.2.9	Quantitative PCR (qPCR).....	31
4.2.10	Gelelektrophorese	32

4.2.10.1	Agarosegelelektrophorese	32
4.2.10.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Optimierung der PCR-Bedingungen	33
5.2	Einfluss der Zytokine auf die Genexpression in den Zelllinien	38
5.2.1	Konventionelle PCR	38
5.2.2	Low-volume-RT-PCR	40
5.2.2.1	HTR-8/SVneo	41
5.2.2.2	JEG-3	43
5.2.2.3	JAR	44
5.2.3	Single-cell-PCR	45
5.2.4	qPCR	46
6	Diskussion	61
7	Schlussfolgerungen	68
8	Literaturverzeichnis	70
9	Anhang	77

1 Zusammenfassung

Trophoblastzellen sind embryonale Zellen, die bei der Entwicklung der Plazenta invasiv in mütterliches Gewebe vordringen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden Trophoblastzellen schon oft mit malignen Tumorzellen verglichen. Anders als die Tumorzellen werden Trophoblastzellen jedoch spezifisch gesteuert und am unkontrollierten Wachstum gehindert. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der JAK-STAT-Signalweg. Aus der Erforschung der genauen Steuerung dieses Signalweges erhofft man sich, einerseits Erkenntnisse über Schwangerschaftspathologien und Immunprozesse zu gewinnen, zum anderen im Vergleich mit Tumorzellen deren Pathomechanismen und mögliche Beeinflussbarkeit zu ergründen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der drei Zytokine LIF, Oncostatin M und GM-CSF auf die Expression verschiedener Zielgene des JAK-STAT-Signalweges in den drei Trophoblastzelllinien JEG-3, HTR-8/SVneo und JAR mithilfe verschiedener PCR-Verfahren vergleichend zu untersuchen.

Zur Etablierung diente die konventionelle PCR, deren Sensitivität für eine Expressionsanalyse jedoch zu gering ist. In der hochsensitiven *Low-volume-PCR* konnte eine deutliche Steigerung der Expression von SOCS3 (eines Inhibitors des JAK-STAT-Signalweges) nach LIF-Stimulation von HTR-8/SVneo-Zellen gezeigt werden, jedoch nicht nach Stimulation von JEG-3- und JAR-Zellen. Eine mögliche Erklärung könnten Mutationen der Tumorzelllinien JEG-3 und JAR im Gegensatz zur nicht tumorösen Zelllinie HTR-8/SVneo sein. Zur Untersuchung unterschiedlicher Genexpressionsmuster der einzelnen Zellen einer Population wurde die *Single-cell-PCR* erprobt. Dabei handelt es sich um die Durchführung einer *Low-volume-PCR* mit einzelnen Zellen. Deren methodische Mängel konnten aber nicht zufriedenstellend beseitigt werden. In der quantitativen *Real-time-PCR* (qPCR) konnte gezeigt werden, dass CASP4 und PIAS3 sowohl in JEG-3- als auch in JAR-Zellen nach LIF-Stimulation vermehrt exprimiert zu werden scheinen. Trophoblastzellen wandeln mithilfe der CASP4 das Zytokin IL-1 β in seine aktive Form um und ermöglichen so die Implantation des Embryos. PIAS3 ist wie SOCS3 ein Inhibitor des JAK-STAT-Signalweges. Diese Ergebnisse bedürfen jedoch aufgrund der geringen Zahl an Versuchswiederholungen und noch nicht abschließend beseitigter methodischer Unsicherheiten weiterer Überprüfung. Die Etablierung genannter Verfahren erlaubt für die Zukunft die Ausweitung der Versuche auf andere Zelllinien, andere Zytokine und andere Zielgene.

2 Einleitung

2.1 Plazentaentwicklung

Die Plazenta ist das für die Versorgung des Embryos und somit die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft entscheidende Organ. Sie ist einerseits Austauschfläche für Blutgase, Elektrolyte, Nährstoffe, Stoffwechselschlacken, Hormone und auch Antikörper, andererseits bildet sie als endokrinologisches Organ zahlreiche Hormone.

Die Entwicklung der Plazenta wird durch den Kontakt embryonaler Zellen mit dem mütterlichen Endometrium ausgelöst; die reife Plazenta besteht sowohl aus Zellen des Keimes als auch aus Zellen der Mutter.

Die nach der Befruchtung der Eizelle durch die Verschmelzung von männlichem und weiblichem Vorkern entstandene Zygote entwickelt sich zunächst durch mitotische Teilungen innerhalb der Zona pellucida zur Morula. In dieser aus 16 bis 32 Zellen bestehenden Form wird vier Tage nach der Befruchtung das Uteruslumen erreicht. Hier entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Raum innerhalb der Morula, die Blastozystenhöhle. Sie teilt die Zellen in zwei morphologisch unterscheidbare Gruppen: Die innere Zellmasse wird als Embryoblast, die umgebenden Zellen werden als Trophoblast bezeichnet (Abb. 1).

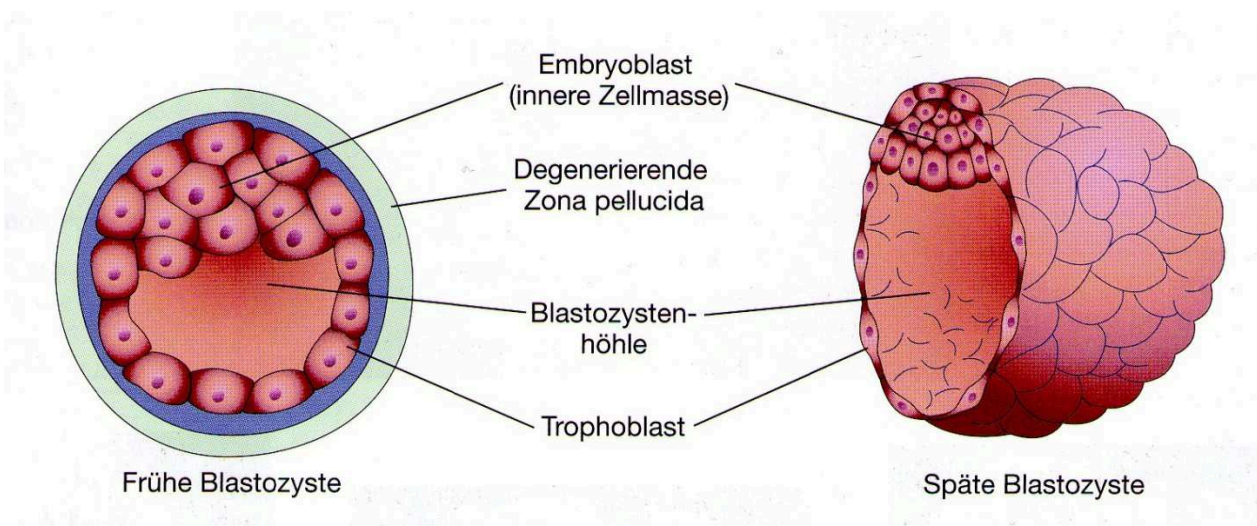


Abb. 1 **Schnitte durch die Blastozyste.** Innerhalb der Morula hat sich die Blastozystenhöhle gebildet, die Embryoblast und Trophoblast voneinander trennt (Moore 2007).

Die Zona pellucida, die zunächst noch die Morula umgab, degeneriert und gibt so den Trophoblasten frei, der daraufhin in Kontakt mit der Uterusschleimhaut treten kann.

Während es sich bei den Zellen des Embryoblasten um pluripotente Stammzellen handelt, sind die Trophoblastzellen hochdifferenziert. Aus ihnen entwickelt sich die Plazenta.

Am sechsten Tag nach der Befruchtung heften sich die Trophoblastzellen an das mütterliche Endometrium an. Die Zellen proliferieren und bilden als äußere Schicht den Synzytiotrophoblasten, in dem es keine Zellgrenzen mehr gibt. Der innere Anteil wird im Gegensatz dazu nun als Zytotrophoblast bezeichnet (Abb. 2).

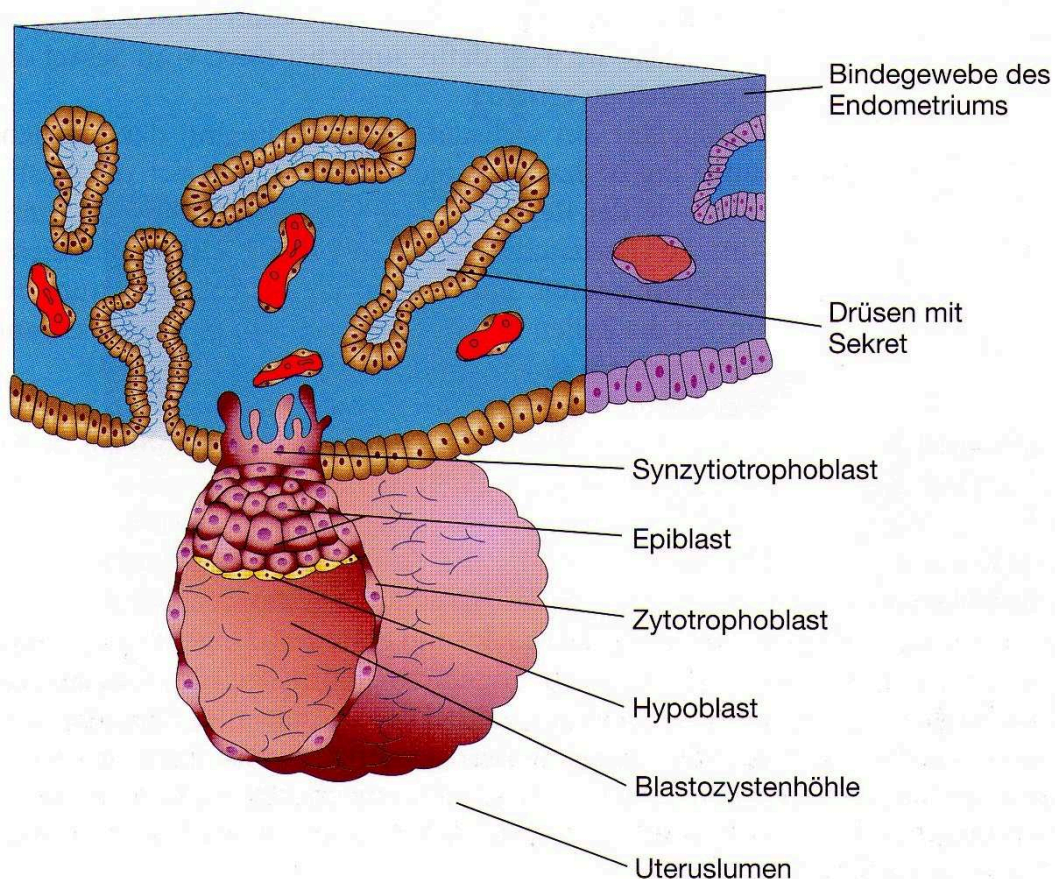


Abb. 2 **Beginn der Implantation.** Nach der Anheftung des Trophoblasten an das Endometrium bildet sich als äußere Schicht der Synzytiotrophoblast. Dieser wächst in das Bindegewebe des Endometriums ein (Moore 2007).

Auf mütterlicher Seite wird durch das Einwachsen des Synzytiotrophoblasten die deziduale Reaktion ausgelöst. Dadurch kommt es in unmittelbarer Nähe des Synzytiotrophoblasten zur Apoptose mütterlicher Deziduazellen, glykogenreicher Bindegewebszellen des Endometriums, die so der Ernährung des Keims dienen. Entferntere Zellen bilden *Tight junctions* (besonders enge Zellverbindungen, die nur für wenige Stoffe durchlässig sind) aus. So entsteht ein immunologisch geschützter Raum.

Im Synzytiotrophoblasten bilden sich daraufhin Lakunen, die Kontakt zu mütterlichen Kapillaren und später auch Spiralarterien erhalten, so dass sie sich mit mütterlichem Blut füllen. Dadurch kann bereits eine einfache Plazentafunktion erfüllt werden.

Bei der weiteren Entwicklung des Embryoblasten entsteht das extraembryonale Mesoderm, ein Gewebe, dessen parietales Blatt mit dem Zyto- und Synzytiotrophoblasten das Chorion bildet. Dieses Chorion bildet die Chorionzotten aus, die als fetaler Anteil der Plazenta in den intervillösen Raum ragen, der mütterliches Blut enthält. Auf mütterlicher Seite bildet das als Decidua basalis bezeichnete Gewebe die Basalplatte, an der sich Chorionzotten fest anhaften können. Mütterliche Plazentarsepten, die durch Vorwachsen der Chorionzotten mit Aushöhlung der mütterlichen Dezidua entstehen, unterteilen die Plazenta in Kotyledone (Abb. 3). Durch den Anschluss der mütterlichen Endometriumarterien und -venen an den intervillösen Raum werden die zunehmend verzweigten Chorionzotten von mütterlichem Blut umspült. In den Zotten bilden sich fetale Gefäße, so dass sich an den freien, terminalen Zotten die Austauschfläche zwischen fetalem und maternalem Kreislauf bildet (Moore 2007).

Endometriums (Lopata et al. 2002). Zytokinvermittelte Expression und Interaktion von Integrinen und anderen Zelladhäsionsmolekülen festigt diese Bindung (McEwan et al. 2009). Unterteilt in Zyto- und umgebenden Synzytiotrophoblasten invadieren die Trophoblastzellen in die mütterliche Dezidua. Nach Ausbildung der Chorionzotten entstehen dann in der Zytotrophoblastschicht der Haftzotten die extravillösen Zytotrophoblastzellen (EVT). Diese durch besondere Invasivität gekennzeichneten Zellen dringen weiter in mütterliches Gewebe ein und bilden Subpopulationen. Zu den EVT zählen die Zytotrophoblastschale, die die Dezidua vom intervillösen Raum trennt (Abb. 3), der verteilt in der Dezidua liegende interstitielle Trophoblast, Trophoblastenriesenzellen im Plazentabett und schließlich der endovaskuläre Trophoblast, der die Spiralarterien im Endometrium und Teilen des Myometriums arrodiert und remodelliert. Der endovaskuläre Trophoblast ersetzt das mütterliche Gefäßendothel, während die Tunica media verloren geht, so dass die mütterlichen Gefäße von der autonomen Blutdruckregulation unabhängig weit gestellt werden. So wird die kontinuierliche Versorgung des Embryos gewährleistet (Moore 2007).

Auf molekularer Ebene wird die Invasion der Trophoblasten vor allem durch die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) ermöglicht. Zur Gruppe der MMPs zählen beim Menschen 23 hydrolytische Enzyme. Die erste MMP wurde bereits 1962 im Schwanz der Kaulquappe entdeckt, an deren Abbau sie während der Metamorphose des Tieres beteiligt war (Gross und Lapiere 1962). Mittlerweile sind über die Degradation der extrazellulären Matrix hinaus viele weitere Funktionen der MMPs bekannt. Die in vorliegender Arbeit untersuchten MMPs 2 und 9 bilden die Subgruppe der Gelatinasen und werden so auch als Gelatinase A und Gelatinase B bezeichnet.

MMP2 entsteht aus einem ubiquitär exprimierten 72-kDa-Proenzym, das glykosyliert und aktiviert wird. Für die Aktivierung sind TIMP2 (*tissue inhibitor of matrix metalloproteases 2*) und MMP14 nötig (Deryugina et al. 2001), aber auch aktiviertes Protein C kann MMP2 aktivieren (Nguyen et al. 2000). Dabei kommt es auf die Konzentration der beteiligten Enzyme an. TIMP2 inhibiert in hoher Konzentration die Aktivität von MMP2. Neben der Spaltung von Typ-I-, -IV-, und -V-Kollagen, denaturiertem Kollagen, Elastin und Vitronektin (Chakrabarti und Patel 2005) ist MMP2 auch an der Neovaskularisation beteiligt (Shapiro et al. 2010). Über die Prozessierung von Signalproteinen spielt MMP2 außerdem bei Inflammationsprozessen eine Rolle (Schonbeck et al. 1998). Trotzdem zeigen MMP2-Knockout-Mäuse einen normalen Phänotyp, da der Ausfall der wichtigen Funktionen von

MMP2 durch das ähnliche MMP9 kompensiert werden kann (Esparza et al. 2004).

MMP9 wurde 1974 in humanen Leukozyten entdeckt (Sopata und Dancewicz 1974) und entsteht aus einem 92-kDa-Proenzym. Aktiviert wird MMP9 unter anderem durch MMP3 (Ogata et al. 1992). MMP9 spielt eine besondere Rolle in der Angiogenese, denn einerseits setzt es die aktive Form von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) frei, andererseits degradiert es die Proteine der vaskulären Basalmembran (Bergers und Coussens 2000). So zeigen MMP9-Knockout-Mäuse aufgrund der fehlenden Proteaseaktivität während der Implantation eine gestörte Fertilität (Dubois et al. 2000). Wie MMP2 spielt MMP9 aber auch eine große Rolle bei der Prozessierung von Signalproteinen. So werden IL-8, IL-1 β und TGF- β durch MMP9 aktiviert (Chakrabarti und Patel 2005). MMP9 wird im Gegensatz zu MMP2 aber nicht durch TIMP2, sondern durch TIMP1 gehemmt (Crocker et al. 2004) und ist auch kein ubiquitär exprimiertes Enzym, sondern wird vor allem durch inflammatorische Stimuli induziert (Opdenakker et al. 1991). So erfährt die Erforschung der MMP9 auch großes Interesse im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder chronischem Asthma bronchiale sowie vielen Tumorerkrankungen (Bjorklund und Koivunen 2005).

Zur Studie der vielfältig miteinander verwobenen Prozesse bei Implantation, Angiogenese und Signaltransduktion wurden in vorliegender Arbeit MMP2, MMP9 und TIMP1 untersucht.

Eine weitere wichtige Proteingruppe bilden die Caspasen. Deren Name leitet sich vom englischen *cysteiny*-*aspartate specific protease* ab. Es handelt sich also um Cysteinproteasen, die Peptidbindungen spezifisch an Aspartatresten spalten. Die entscheidende Rolle der Caspasen liegt in der Regulation der Apoptose, die einerseits die Gewebekomöostase im erwachsenen Organismus aufrechterhält, andererseits besondere Wichtigkeit bei der Entwicklung eines Organismus hat. Caspase-3- und -9-Knockout-Mäuse sterben perinatal, da vor allem die Hirnentwicklung durch fehlende Apoptose massiv gestört ist (Ranger et al. 2001). So überrascht es nicht, dass Tumorstadium auf einer Störung der Caspase-gesteuerten Apoptose beruhen kann. Die erste Caspase wurde 1986 im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Ellis und Horvitz 1986). Mittlerweile sind in Insekten sowie Säugetieren eine Vielzahl an verschiedenen Caspasen bekannt. Sie werden eingeteilt in Initiator- und Effektorcaspasen. Diese unterscheiden sich in der Länge ihrer N-terminalen Prodomäne, wobei die Procaspasen mit langer N-terminaler Domäne die Gruppe der Initiatorcaspasen bilden und eine kurze N-terminale

Prodomäne auf eine Effektorcaspase hinweist. Durch die Initiatorcaspasen wird die Caspasenkaskade eingeleitet; die Effektorcaspasen spalten dann eine Vielzahl vitaler Zellproteine und führen so die Apoptose aus. Jenseits der Apoptoseregulation wurden jedoch noch vielfältige andere Aufgaben der Caspasen entdeckt. Die als Caspase-1-Subfamilie bezeichneten Caspasen 1, 4 und 5 regulieren inflammatorische Prozesse über Interleukin-Signalwege, die auch an der Grenzfläche zwischen mütterlichem und fetalem Kreislauf eine besondere Rolle spielen. Selbst aktiviert durch Lipopolysaccharide und Interferone, prozessieren die Caspasen Prointerleukine (Launay et al. 2005). Für die in vorliegender Arbeit untersuchte Caspase-4 im Speziellen wurde gezeigt, dass sie auch in TNF- α -Signalwege involviert ist (Nickles et al. 2012) und eine wichtige Rolle bei der Bildung von Inflammasomen spielt (Sollberger et al. 2012). Dabei handelt es sich um Proteinkomplexe innerhalb von Zellen, die über IL-1 β eine Entzündungsreaktion auslösen. Dieses wird von Caspase-4 aktiviert (Kamens et al. 1995). IL-1 β wiederum inhibiert die Expression von TIMP-1 (Huang et al. 1998).

2.3 Plazentafehlentwicklung und maligne Trophoblasten

Die zeitlich und räumlich begrenzte Invasivität der Trophoblasten bei der Plazentaentwicklung ist streng kontrolliert. Zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren, deren Bindeproteine und Bestandteile der Extrazellulärmatrix steuern Proliferation, Migration und Invasivität der Trophoblasten (Fitzgerald et al. 2005a), die im Grunde auf den gleichen Mechanismen beruhen wie ebendiese Eigenschaften bei Tumorzellen (Murray und Lessey 1999). So überrascht es nicht, dass aus Fehlsteuerung der Kontrollmechanismen eine übermäßige Trophoblasteninvasion resultieren kann, die dann zu trophoblastischen Schwangerschaftsneoplasien und Chorionkarzinomen führen kann. Umgekehrt kann eine verminderte Invasion der EVT-Zellen aber auch zu schlechter Plazentadurchblutung und somit zu Präeklampsie und Wachstumsverzögerung des Feten führen (Moore 2007).

Die genauen molekularen Mechanismen der Proliferations- und Invasionsregulation sind gerade auch wegen der Parallelen zum Tumorwachstum aktueller Forschungsgegenstand, aber trotz zahlreicher Entdeckungen in weiten Teilen noch unverstanden. Im Folgenden wird auf den in der vorliegenden Arbeit untersuchten JAK-STAT-Signalweg und seine Botenstoffe näher eingegangen.

2.4 Die IL-6-Zytokinfamilie

Zytokine sind eine heterogene Gruppe aus Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die in verschiedensten Geweben sezerniert werden und vor allem parakrin wirken. Zu ihnen gehören zum Beispiel die Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*) und PDGF (*platelet derived growth factor*), das für die Bildung von Erythrozyten wichtige Erythropoietin, die vor allem auf Leukozyten wirkenden Interleukine, der pleiotrope TNF α (Tumornekrosefaktor alpha) und viele weitere Faktoren (Löffler 1999).

Zur IL-6-Zytokinfamilie gehören das namensgebende Interleukin-6 (IL-6), IL-11, LIF (*leukaemia inhibitory factor*), Oncostatin M, CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*cardiotrophin 1*) und CLC (*cardiotrophin-like cytokine*).

Ihre Wirkung entfalten Zytokine über die Bindung an membranständige Zytokinrezeptoren oder diesen ähnliche Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Die IL-6-Zytokinfamilie bindet an die mit dem JAK-STAT-Signalweg gekoppelten Zytokinrezeptoren. Diese bestehen aus mehreren Untereinheiten, die sich durch die Ligandenbindung zu einem Rezeptorkomplex formieren. Die Untereinheiten sind Moleküle mit je einer Transmembrandomäne, die zwischen extrazellulärem und zytoplasmatischem Molekülanteil liegt. Je nach Ligand, der an den extrazellulären Molekülanteil bindet, wird ein Dimer aus verschiedenen Rezeptoruntereinheiten gebildet (Löffler 1999). Mindestens eine Untereinheit ist dabei ein GP130-Molekül. Wie die Abkürzung nahelegt, handelt es sich hierbei um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa (Hibi et al. 1990). Einige Zytokine binden an ein GP130-Homodimer, andere an ein Heterodimer aus GP130 und dem LIF- oder Oncostatin M-Rezeptor oder benötigen noch eine zusätzliche, dritte Rezeptoruntereinheit (Robledo et al. 1997)

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit zur Zellstimulation genutzten Zytokine LIF und Oncostatin M genauer charakterisiert.

2.4.1 LIF

LIF (*leukemia inhibitory factor*) ist ein wichtiges Zytokin aus der IL-6-Zytokinfamilie. Es ist ein glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 37000 bis 62000 Da (abhängig vom Grad der Glykosylierung) und wurde zunächst aus dem Medium kultivierter Tumorzellen isoliert (Tomida et al. 1984b, Hilton et al. 1988). Dann konnte es aus cDNA muriner T-Lymphozyten kloniert werden (Gearing et al. 1987) und schließlich auch aus

humaner DNA (Gough et al. 1988). Es wurde als ein Faktor beschrieben, der die Ausreifung von murinen Leukämiezellen zu Makrophagen induzieren kann, was zum Namen des Zytokins führte (Tomida et al. 1984a, Gearing et al. 1987). Mittlerweile sind jedoch pleiotrope Effekte von LIF bekannt. LIF-mRNA ist in vielen Organen nachweisbar und in nahezu jeder Zelle ist die LIF-Produktion durch eine große Zahl an Mediatoren induzierbar (Brown et al. 1994). Es reguliert beispielsweise Vorgänge von der verletzungsinduzierten Neurogenese (Bauer et al. 2003) über die Nephronentstehung in der Niere (Barasch et al. 1999) bis zum Kapillarwachstum (Paradis und Gendron 2000). Viele dieser Effekte können jedoch aufgrund der in der IL-6-Zytokinfamilie ähnlichen Rezeptoren auch durch andere Zytokine der IL-6-Zytokinfamilie übernommen werden (Gearing und Bruce 1992). So sind LIF-Knockout-Mäuse entgegen den Erwartungen lebensfähig, können sich aber nicht fortpflanzen. Denn insbesondere auch in Drüsenzellen des Uterus wird LIF produziert und ist dabei für die Implantation von großer Bedeutung (Stewart et al. 1992). LIF stimuliert die Trophoblasten zur Bildung von Choriongonadotropin und Fibronektin, das die Anheftung an den Uterus begünstigt (Nachtigall et al. 1996), führt zur Bildung von HLA-G auf der Trophoblastenoberfläche, das für die Immuntoleranz der Mutter von Bedeutung ist (Bamberger et al. 2000) und erhöht Zellproliferation sowie Invasivität der Trophoblasten (Fitzgerald et al. 2005b). Über eine negative Rückkopplung des JAK-STAT-Signalweges supprimiert LIF auch seine eigenen Effekte. STAT3 induziert dafür den Inhibitor SSI-1 (*STAT-induced STAT inhibitor-1*), der Januskinasen hemmen kann (Naka et al. 1997).

Vor allem die Veröffentlichung von Frau Dr. Justine Fitzgerald aus diesem Labor zur gesteigerten Zellproliferation und Invasivität der Trophoblasten durch LIF-Stimulation bildete einen Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit (Fitzgerald et al. 2005b).

2.4.2 Oncostatin M

Oncostatin M ist ein weiteres wichtiges Zytokin aus der IL-6-Zytokinfamilie. Es ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 28000 Da und wurde erstmals 1986 aus dem Kulturüberstand von zur Differenzierung angeregten U-937-Lymphomzellen isoliert. Namensgebend war die Unterdrückung des Wachstums von A375-Melanomzellen durch dieses neue Zytokin (Zarling et al. 1986). Seitdem wurden für Oncostatin M allerdings - genau wie für das sehr ähnliche Zytokin LIF (siehe oben) - pleiotrope Effekte entdeckt. Es wurden weitere Tumorzellen entdeckt, deren Wachstum Oncostatin M hemmen kann, wie

zum Beispiel Meningeomzellen (Schrell et al. 1998), aber auch das Wachstum gewöhnlicher Endothelzellen wird inhibiert (Takashima und Klagsbrun 1996). Andererseits wird das Wachstum von Fibroblasten stimuliert (Zarling et al. 1986). Oncostatin M führt außerdem zur Differenzierung verschiedener Tumorzellen (Bruce et al. 1992) und Megakaryozyten (Begley 1994), andererseits inhibiert es die Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro (Rose et al. 1994). Weitere Bedeutung kommt Oncostatin M im Knochenstoffwechsel zu (Jay et al. 1996), sowie bei der Entwicklung von Nervensystem (Morikawa 2005) und Leber (Kamiya et al. 1999). Auch in der Beendigung der Akute-Phase-Reaktion der Entzündung spielt Oncostatin M eine Rolle (Wahl und Wallace 2001), so dass es in der Erforschung inflammatorischer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis schon längere Zeit großes Interesse hervorruft (Hui et al. 1997).

Oncostatin M hat zwar eine eigene Zytokinrezeptoruntereinheit (siehe Kapitel 2.4), kann aber auch an das Heterodimer aus GP130 und LIF-Rezeptor binden, was die zum Teil ähnlichen Wirkungen von LIF und Oncostatin M erklärt (Gearing und Bruce 1992). So liegt auch die Vermutung nahe, dass Oncostatin M, genauso wie LIF, über den JAK-STAT-Signalweg Einfluss auf Trophoblasten nimmt. Erst 2012 erschien eine Veröffentlichung, in der die erhöhte Invasivität von Trophoblasten nach Stimulation mit Oncostatin M beschrieben wurde (Ko et al. 2012). Insbesondere der Einfluss auf die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 wurde hier untersucht und eine erhöhte Expression nach Stimulation gezeigt.

2.5 Das Zytokin GM-CSF

GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) ist ein (nicht zur IL-6-Zytokinfamilie gehörendes) hämatopoetisches Zytokin, dessen humane Form 1984 aus dem Medium kultivierter Leukämiezellen isoliert wurde. Es handelt sich um ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 22000 Da (Gasson et al. 1984). Synthetisiert wird GM-CSF von T-Lymphozyten (Cline und Golde 1974) und B-Lymphozyten (Pluznik et al. 1989), aber auch von anderen Zellen des Immunsystems sowie Endothelzellen (Malone et al. 1988) und verschiedenen Gewebszellen (Gasson 1991). Insbesondere die luminale Endometriumzellschicht (Robertson et al. 1992) und Trophoblasten (Kanzaki et al. 1991) gehören zu den GM-CSF-produzierenden Zellen. Rezeptoren für GM-CSF wurden an allen reaktionsfähigen Zellen der hämatopoetischen Stammreihe (Park et al. 1986, DiPersio et al. 1988), aber z. B. auch an Trophoblasten (Gearing et al. 1989)

nachgewiesen. Bei dem Rezeptor handelt es sich um einen heterodimeren Rezeptor der Hämatopoietin-Rezeptorfamilie, der über den JAK-STAT-, den MAPK- und den PI3-K-Signalweg die Transkription verschiedener Gene reguliert (Martinez-Moczygemba und Huston 2003). So ist GM-CSF an der Proliferationsstimulation von Knochenmark, Immunzellen und Endothelzellen sowie an der Aktivitätssteigerung vieler Zellen des Immunsystems beteiligt (Gasson 1991). Außerdem wurden im Rahmen der Embryonalentwicklung, Implantation und Plazentation mehrere Effekte von GM-CSF nachgewiesen, die im Folgenden beschrieben werden. Mäuse mit GM-CSF-Null-Mutation zeigen eine retardierte Plazentaentwicklung mit resultierender Wachstumsretardierung des Fetus (Robertson et al. 1999). Im Gegensatz dazu erreichen im Rahmen der In-vitro-Fertilisation in Anwesenheit von GM-CSF kultivierte Embryonen das Blastozystenstadium schneller und enthalten mehr Zellen (Sjoblom et al. 1999). Die GM-CSF-Rezeptoren auf Trophoblasten sind vor allem auf Zytotrophoblasten und invadierenden extravillösen Trophoblasten nachzuweisen und weniger auf Synzytiotrophoblasten. Auch Zellen der Zelllinien JEG-3 und JAR exprimieren den Rezeptor (Jokhi et al. 1994). Exogen zugeführtes GM-CSF bewirkt hier eine Differenzierung der Trophoblasten in reife Synzytiotrophoblasten und stimuliert die Sekretion verschiedener Hormone (Garcia-Lloret et al. 1994), während die Zugabe eines anti-GM-CSF-Antikörpers die Proliferation der Zelllinien JEG-3, JAR und BEWO hemmt (Wegmann und Guilbert 1992). GM-CSF ist also nicht nur für die Immunregulation ein wichtiges Zytokin, sondern auch für Wachstum und Differenzierung von Trophoblasten von Bedeutung.

GM-CSF sowie das ähnliche Zytokin G-CSF wurden außerdem durch Frau Eichelkraut (Eichelkraut 2011) und Frau Krause (Krause 2011) in Bachelorarbeiten im Plazentalabor untersucht.

Frau Eichelkraut untersuchte den Einfluss von GM-CSF und G-CSF auf HTR-8/SVneo- und JEG-3-Zellen und konnte eine gesteigerte Migration der HTR-8/SVneo-Zellen nach Stimulation nachweisen; JEG-3-Zellen ließen sich hingegen bezüglich der Migration nicht beeinflussen, stattdessen zeigte sich eine verringerte Invasivität nach GM-CSF-Stimulation aufgrund einer geringeren MMP2-Expression.

Frau Krause stimulierte HTR-8/SVneo- und JAR-Zellen mit GM-CSF und G-CSF und konnte dabei für die HTR-8/SVneo-Zellen eine Steigerung der STAT5-Expression nach einer halben Stunde Stimulation und eine verringerte Expression nach längerer

Stimulationszeit zeigen. Eine Änderung des Migrations- und Invasionsverhaltens konnte sie jedoch nicht nachweisen. Bei GM-CSF-Stimulation der JAR-Zellen zeigte sich jedoch eine verringerte Invasion und Migration der Zellen ohne nachweisbaren Einfluss auf einen der untersuchten Botenstoffe des JAK-STAT-Signalweges.

2.6 Der JAK-STAT-Signalweg

Die Bindung der verschiedenen Zytokine an ihre Rezeptoren führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege. Der im Zusammenhang mit Trophoblastenwachstum und -invasion am meisten untersuchte Signalweg ist der JAK-STAT-Signalweg (*Januskinasen-Signal Transducers and Activators of Transcription-Signalweg*). Er scheint einer der bedeutendsten Signalwege der Trophoblastensteuerung zu sein (Fitzgerald et al. 2005a), ist aber zum Beispiel auch für Immunprozesse (Ivashkiv 2000) und Hämatopoese (Ward et al. 2000) von zentraler Bedeutung.

Eine schematische Darstellung des Signalweges findet sich in Abb. 4.

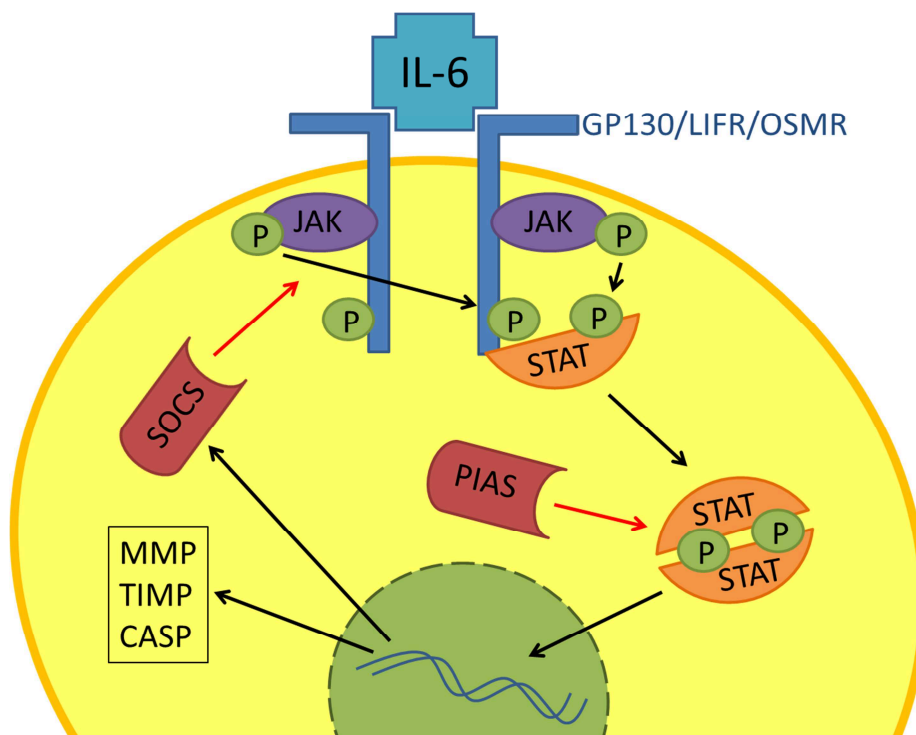


Abb. 4 **Schematische Darstellung des JAK-STAT-Signalweges in einer Zelle.** IL-6: Zytokin der IL-6-Familie; GP130/LIFR/OSMR: Glykoprotein 130, LIF-Rezeptor oder Oncostatin-M-Rezeptor; JAK: Januskinase; P: Phosphorylierter Aminosäurenrest; STAT: STAT-Molekül; PIAS: Protein der PIAS-Familie; SOCS: Protein der SOCS-Familie; MMP: Matrix-Metalloproteasen; TIMP: *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases*; CASP: Caspasen. Schwarze Pfeile bilden die folgende Wirkung ab, rote Pfeile drücken eine hemmende Wirkung aus.

Die Rezeptoren des JAK-STAT-Signalweges sind Zytokinrezeptoren, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Sie formieren sich durch die Ligandenbindung zu einem Rezeptorkomplex (siehe Kapitel 2.4).

Durch die Bildung des Rezeptorkomplexes kann sich nun je eine Januskinase an den zytoplasmatischen Anteil einer Rezeptoruntereinheit wie GP130, LIF-Rezeptor oder Oncostatin M-Rezeptor anlagern. Januskinasen sind tyrosinspezifische Kinasen und phosphorylieren als solche Tyrosinreste der zytoplasmatischen Ketten der Rezeptormoleküle. Die bedeutendste der Januskinasen ist die JAK1; ihr Fehlen hat schwerwiegende Folgen für die betreffende Zelle (Guschin et al. 1995), daneben existieren jedoch noch weitere Kinasen wie JAK2 und TYK2 (Stahl et al. 1994). Zusätzlich zu Ihrer wichtigen Rolle bei der Signaltransduktion kommt den Januskinasen außerdem eine Bedeutung für die Regulation der Rezeptorexpression zu (Radtko et al. 2002).

Die phosphorylierten zytoplasmatischen Tyrosinreste der Rezeptormoleküle werden zu Bindungsstellen für Moleküle mit einer SH2-Domäne, wie zum Beispiel die STATs. Sie lagern sich an die Rezeptormoleküle an und ihre Tyrosin- und Serinreste werden ebenfalls durch die Januskinasen phosphoryliert. Daraufhin dissoziieren die STATs wieder vom Rezeptorkomplex und bilden Dimere. In dieser Form können die STATs in den Zellkern translozieren und direkt die Transkription regulieren (Löffler 1999).

STAT ist die Abkürzung für *Signal Transducers and Activators of Transcription*, als Dimere fördern STATs also im Kern die Transkription verschiedener Gene. Es sind sieben STATs bekannt, STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6, die Homo- und Heterodimere bilden können. Vor allem von STAT3 und 5 ist bekannt, dass sie durch Phosphorylierung ohne Ligandenbindung und somit daueraktiviert an Tumorstadium beteiligt sind (Bromberg et al. 1999, Migone et al. 1995), wohingegen die von STAT1 aktivierten Gene antiproliferative Effekte zu haben scheinen und mangelnde Aktivierung von STAT1 zu Tumorstadium führt (Bromberg et al. 1998).

Einen direkten negativen Rückkopplungsmechanismus bildet die Transkription von SOCS-Proteinen. Zu dieser Familie gehören SOCS1-7 sowie CIS. SOCS steht hierbei für *Suppressor Of Cytokine Signaling* und CIS für *Cytokine-Inducible SH2-containing protein*. Die SOCS-Proteine inhibieren den JAK-STAT-Signalweg auf unterschiedliche Weisen. SOCS1 und 3 interagieren mit den Januskinasen und inhibieren so ihre katalytische Aktivität (Nicholson et al. 1999). Für CIS ist nachgewiesen, dass es mit STAT5b um phosphorylierte Tyrosinreste des Zytokinrezeptors konkurriert und so dessen Aktivierung hemmt (Ram und Waxman 2000). Als dritter Mechanismus wird durch die SOCS-Proteine der proteosomale Abbau von aktivierten Signalproteinen eingeleitet (Zhang et al. 1999).

Weiteren inhibitorischen Einfluss auf den JAK-STAT-Signalweg hat die PIAS-Proteinfamilie. PIAS steht für *Protein Inhibitor of Activated STAT* und bei Säugetieren sind die Formen PIAS1, 3, x und y nachgewiesen. Wie die SOCS-Proteine haben auch die PIAS-Proteine unterschiedliche Wirkmechanismen. Zum einen binden PIAS1 und 3 direkt an STAT-Dimere und verhindern deren Transkriptionsaktivierung (Chung et al. 1997, Liu et al. 1998). PIASx und PIASy aktivieren hingegen Ko-Repressoren wie Histondeacetylasen (Arora et al. 2003, Liu et al. 2001). Desweiteren kann PIAS1 durch Sumoylierung (einem der Ubiquitylierung ähnlichen Prozess) den proteosomalen Abbau von STAT1 beschleunigen (Ungureanu et al. 2003). In vivo zeigte sich durch das Fehlen von PIAS-

Homologen bei *Drosophila* den Erwartungen entsprechend eine höhere Entstehungswahrscheinlichkeit für Leukämien (Betz et al. 2001).

2.7 Regulation des JAK-STAT-Signalweges in Trophoblasten

Eine Zusammenfassung der bis 2005 bekannten Zusammenhänge zwischen Zytokinen, Signalwegen und deren Effekten auf die Trophoblasteninvasion findet sich in einer Veröffentlichung aus diesem Labor (Fitzgerald et al. 2005a). In dieser Arbeit ist eine Vielzahl an Botenstoffen, wie unterschiedlichsten Wachstumsfaktoren, verschiedenen Interleukinen, TNF- α , Leptin und anderen Zytokinen aufgelistet.

Im Folgenden wird auf die für vorliegende Arbeit relevanten Erkenntnisse sowie auf aktuelle Entwicklungen eingegangen.

Zur Wirkung von GM-CSF wurde schon 1992 berichtet, dass es von humanen extravillösen Trophoblastzellen, die aus Ersttrimester-Plazenten isoliert wurden, gebunden wird und deren DNA-Synthese und Proliferation (gemessen anhand eines Cytokeratins und des nukleären Proliferationsantigens Ki-67) bewirkt (Loke et al. 1992). Zudem wird die Differenzierung zu einem Synzytium angeregt (Morrish et al. 1998). Als genutzter Signalweg wurde der Proteinkinase-C-Signalweg angegeben (Imakawa et al. 1997). In anderen Zellen wurde aber auch über die Aktivierung von JAK2 und STAT5 berichtet (Watanabe et al. 1996, Ooi et al. 1998). Eine jüngere Veröffentlichung berichtet speziell über die Stimulation des JAK-STAT-Signalweges in JEG-3-Zellen durch das dem GM-CSF ähnliche G-CSF (Marino und Roguin 2008).

Ebenfalls durch Frau Dr. Fitzgerald und Mitarbeiter aus dem Plazentalabor wurde bereits die Wirkung von LIF auf JEG-3-Zellen untersucht (Fitzgerald et al. 2005b). Dabei konnte besonders die gesteigerte STAT3-Phosphorylierung durch LIF gezeigt werden. Dadurch weisen LIF-stimulierte JEG-3-Zellen eine gesteigerte Proliferation auf und können leichter in eine artifizielle extrazelluläre Matrix invadieren. Zudem konnte eine Herabregulation von TIMP1 und eine Heraufregulation von Caspase-4 gezeigt werden. Die gesteigerte Differenzierung von Zytotrophoblastzellen zum Synzytiotrophoblasten durch LIF zeigte bereits eine frühere Arbeit (Sawai et al. 1995). Dabei postulierten die Autoren die gesteigerte hCG-Produktion der Zellen nach Stimulation als Mechanismus. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der LIF-Rezeptor-JAK1-STAT3-SOCS3-Signalweg ein essentieller Weg für die Regulation der Differenzierung ist (Takahashi et al. 2008). Schon

vorher hatte sich SOCS3 als LIF-induzierter negativer Rückkopplungsmechanismus des JAK-STAT-Signalweges erwiesen (Takahashi et al. 2003). Speziell für HTR-8/SVneo-Zellen zeigte sich, dass LIF-Stimulation die Translokation von STAT3 in den Zellkern bewirkt und TIMP1, TIMP2, und TIMP3 herabreguliert werden (Suman et al. 2013).

Über die ähnlichen Wirkungen des Zytokins Oncostatin M durch die Bindung an den LIF-Rezeptor wurde bereits im Kapitel 2.4.2 berichtet. Eine Veröffentlichung von 2012 zeigte speziell die gesteigerte Invasion von HTR8/SVneo-Zellen nach Oncostatin M-Stimulation. Es konnte als Mechanismus die gesteigerte Enzymaktivität von Gelatinasen, vor allem MMP2 ausgemacht werden (Ko et al. 2012).

Es zeigt sich also, dass die Regulation der Trophoblasten ein komplexer Prozess ist, in den eine Vielzahl an Botenstoffen und Signalwegen involviert sind, die zudem vielfältig untereinander und mit anderen Prozessen im Körper vernetzt sind. Die vorliegende Arbeit will und kann sich nur mit einem kleinen Ausschnitt dieser faszinierenden Regulationsvorgänge beschäftigen.

3 Ziel der Arbeit

Trophoblastzellen sind stark proliferierende, migrierende und vor allem auch in hohem Maße invasiv wachsende Zellen und als solche malignen Tumorzellen nicht unähnlich. Im Gegensatz zu Tumorzellen werden Trophoblastzellen jedoch durch eine Vielzahl an endo-, para- und autokrinen Signalen daran gehindert, sich unkontrolliert auszubreiten. Die Erforschung solcher Signalwege hat in den letzten Jahren nicht nur zu einem zunehmenden Verständnis der physiologischen und pathologischen Prozesse, sondern auch zur Entwicklung gezielter Therapien geführt. Als Beispiele seien hier die Antikörpertherapien bei inflammatorischen Erkrankungen oder beim Mammakarzinom genannt.

Aus der Erforschung der Signalwege speziell in Trophoblastzellen erhofft man sich einerseits genauere Erkenntnisse über Schwangerschaftspathologien, andererseits spekuliert man darauf, aus den Parallelen zu Tumorzellen Therapiemöglichkeiten für Krebserkrankungen sowie andere Erkrankungen des Immunsystems ableiten zu können. Zu dieser Grundlagenforschung will diese Arbeit einen Beitrag leisten.

LIF, Oncostatin M und GM-CSF sind Zytokine, deren Beeinflussung von Trophoblastzellen bereits bekannt ist. In dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen dieser Beeinflussung genauer untersucht werden, insbesondere der JAK-STAT-Signalweg, der einer der bedeutendsten Signalwege der Trophoblastensteuerung zu sein scheint. Dazu sollte die Expression verschiedener Zielgene dieses Signalweges in den drei verschiedenen Zelllinien HTR-8/SVneo, JEG-3 und JAR nach Stimulation durch LIF, Oncostatin M und GM-CSF mithilfe verschiedener PCR-Verfahren untersucht werden.

Besonderes Augenmerk sollte dabei auf der Etablierung und dem Vergleich der verschiedenen PCR-Methoden, dem Vergleich der verschiedenen Zelllinien untereinander und dem Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen Zytokine liegen. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Zelllinien ist vor allem deshalb von großer Bedeutung, weil diese teilweise durch Virentransfektion, teilweise als Tumorzelllinien immortalisiert vorliegen und so in ihrem Verhalten nicht dem von primären Trophoblastzellen entsprechen.

Bei den verschiedenen PCR-Methoden handelte es sich konkret um die konventionelle PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese, die *Low-volume-RT-PCR* im

AmpliSpeed slide cycler der Firma Beckman Coulter und um die quantitative *Realtime-PCR* (*qPCR*). Erstere diente lediglich zu Vorversuchen wie dem Überprüfen von Primern auf cDNA-Spezifität und zur Ermittlung der Annealingtemperatur der selbst erstellten Primer. Aufgrund der geringen Sensitivität der konventionellen PCR sollten die Stimulationversuche jedoch mit der *Low-volume-RT-PCR* und anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese ausgewertet werden, die schließlich als *Single-cell-PCR* durchgeführt werden sollte. Hier sollten einzelne Zellen mit ihren stimulationsabhängigen Expressionsunterschieden untereinander verglichen werden, da man von abweichenden Expressionsmustern einzelner Zellen innerhalb eines Zellpools ausgeht. Parallel dazu sollten einige Gene mit der qPCR untersucht werden, um dabei eventuell in den vorigen Versuchen nicht erkannte Expressionsunterschiede nachzuweisen. Bei diesen handelt es sich im Gegensatz zur qPCR um Endpunkt-PCRs, die bei hoher Ausgangsexpression eines Gens keinen weiteren Expressionsanstieg nach Stimulation zeigen können. Die qPCR gilt als das sensitivste Verfahren zum Nachweis von Expressionsunterschieden.

Die Etablierung eines geeigneten PCR-Verfahrens sollte zudem den Weg für nachfolgende Versuche ebnen, in denen die Stimulation mit anderen Zytokinen, das Verhalten anderer Trophoblastzelllinien oder die Expression anderer Gene untersucht werden kann.

In dieser Arbeit sollten die Zelllinien HTR-8/SVneo, JEG-3 und JAR nach Stimulation durch die Zytokine LIF, Oncostatin M und GM-CSF zunächst auf die veränderte Expression der JAK-STAT-Signalweg-assoziierten Gene STAT3, MMP2 und 9, SOCS3, TIMP1, PIAS3, CASP4 und GP130 mithilfe der genannten PCR-Verfahren untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Sterilbank *HERAsafe* (Heraeus)

Pipettierhilfe *pipetus* (Hirschmann Laborgeräte)

Brutschrank *HERAcell 150 i* (Heraeus)

Neubauer-Zählkammer *improved* (Assistent)

Mikroskop *Axiovert 25* (Carl Zeiss)

Mikromanipulator *CK2 plus TDU 500 system* (Olympus)

Zentrifugen *Universal 30 F* und *Mikro 22 R* (Hettich)

Photospektrometer *nanodrop ND 1000* (peqlab)

Mastercycler ep gradient S (Eppendorf)

AmpliSpeed slide cycler ASC400D + AmpliSlide-Objektträger (Beckman Coulter)

qTOWER (Analytik Jena)

Transformator *Power Source 300 V* (VWR)

horizontale Gelelektrophoresekammer *40-1214* (peqlab)

vertikale Gelelektrophoresekammer *SE 600* (Hoefer/Serva)

MF chemiBIS 3.2 (DNR Bio Imaging Systems Ltd.)

Scanner *Canoscan 5600 F* (Canon)

4.1.2 Chemikalien

5 x RT Buffer (Fermentas)

6 x Orange DNA Loading Dye (Fermentas)

Acrylamid (Serva)

Agarose (Serva)

Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma)

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (Fermentas)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Serva)

Ethanol (Roth)

Fetales Kälberserum (FKS) (Sigma)

Formaldehyd (Roth)

GM-CSF (Milteniy)

Ham's F12 (PAA)

Hefe-tRNA (Roche)

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Millipore)

MgCl₂-PCR-Puffer 2,5 mM (Fermentas)

Natriumcarbonat (Roth)

Natriumhydroxid (Roth)

nukleasefreies Wasser (Invitrogen)

O'Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder (Fermentas)

Oligo(dT)-Primer (Sigma-Aldrich)

Oncostatin M (ImmunoTools)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (PAA)

Red Safe Nucleic Acid Staining Solution (Intron Biotechnology)

Ribolock RNase-Inhibitor (Fermentas)

RPMI 1640 (PAA)

Salpetersäure (Roth)

Sealing Solution (Beckman Coulter)

Silbernitrat (Roth)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva)

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (Roth)

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (Roth)

Trypanblau (Sigma)

Trypsin/EDTA (PAA)

4.1.3 Kits

InnuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena)

Quick-gDNATM MiniPrep (Zymo Research)

InnuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena)

QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)

SensiFASTTM SYBR No-ROX Kit (Bioline)

4.1.4 Enzyme

MaximaTM Reverse Transcriptase (Fermentas)

DreamTaqTM DNA Polymerase (Fermentas)

RNase (Fermentas)

DNase I (Analytik Jena)

4.1.5 Lösungen

Zellkultur:

Kulturmedium für HTR-8/SVneo- und JAR-Zellen:

10% FKS

90% RPMI 1640

Kulturmedium für JEG-3-Zellen:

10% FKS

90% Ham's F12

Einfriermedium für HTR-8/SVneo- und JAR-Zellen:

30% FKS

10% DMSO

60% RPMI 1640

Einfriermedium für JEG-3-Zellen:

30% FKS

10% DMSO

60% Ham's F12

Reverse Transkription (Maxima™ Reverse Transcriptase):

Tab. 1 **Reaktionsgemisch für die reverse Transkription** mit dem Enzym *Maxima™ Reverse Transcriptase*.

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
RNA in nukleasefreiem Wasser		0,05 g/l	14,5
Oligo-dT-Primer	50 µM	5 µM	2
dNTPs	10 mM	0,5 mM	1
5 Minuten bei 65°C			
5 x RT Buffer	5 x	1 x	4
Ribolock RNase Inhibitor	40 U/µl	1 U/µl	0,5
Maxima Reverse Transcriptase	200 U/µl	10 U/µl	1
Gesamtvolumen			20
30 Minuten bei 50°C			
5 Minuten bei 85°C			

Konventionelle PCR (DreamTaq™ DNA Polymerase):

Tab. 2 **Reaktionsgemisch für die konventionelle PCR** mit dem Enzym *DreamTaq™ DNA Polymerase*.

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
Nukleasefreies Wasser			5,6
PCR-Puffer (MgCl ₂ 2,5mM)	10 x	1 x	1
dNTPs	1,25 mM	0,2 mM	1,6
Template			0,5
Primer forward	10 µM	0,6 µM	0,6
Primer reverse	10 µM	0,6 µM	0,6
DreamTaq-Polymerase	0,5 U/µl	0,025 U/µl	0,1
Gesamtvolumen			10

Low-volume-PCR (QIAGEN OneStep RT-PCR Kit):Tab. 3 **Reaktionsgemisch für die Low-volume-PCR** mit dem *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit*.

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
Nukleasefreies Wasser			0,6
Puffer	5 x	1 x	0,2
dNTPs	10 mM each	400 mM each	0,04
Template	10 ng/µl	1 ng/µl	0,1
RNAse Out	40 U/µl	0,8 U/µl	0,02
Enzym-Mix			0,04
Gesamtvolumen			1
Primer (vorher auftragen)	10 µM	0,6 µM	0,6

qPCR (SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit):Tab. 4 **Reaktionsgemisch für die qPCR** mit dem *SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit*.

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen (µl)
Mastermix	2 x	1 x	5
Primer forward	10 µM	0,3 µM	0,3
Primer reverse	10 µM	0,3 µM	0,3
Template			1
Nukleasefreies Wasser			3,4
Gesamtvolumen			10

Agarosegel (2%ig):

100 ml 1 x TAE

2 g Agarose

5 µl RedSafe Nucleic Acid Staining Solution

Polyacrylamidgele (10%ig):Tab. 5 **Mengenangaben der benötigten Chemikalien für 10%ige Polyacrylamidgele.**

Anzahl Gele	Aqua dest. (ml)	30% Acrylamid (ml)	10 x TBE (ml)	10% APS (µl)	TEMED (µl)
1	13,76	8,3	2,5	416,5	21
2	27,53	16,6	5	833	42

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen (An et al. 2009):

Fixierlösung

5% Ethanol (v/v)

1% Salpetersäure (v/v)

0,1% Silbernitrat (m/v)

Entwicklerlösung

1,3% Natriumhydroxid (m/v)

0,65% Natriumkarbonat (m/v)

0,4% Formaldehyd (v/v)

Stopplösung

5% Ethanol (v/v)

5% Salpetersäure (v/v)

4.1.6 Primer

Tab. 6 **Verwendete Primer** in aufsteigender Amplifikatlänge.

Primer	Transkript-ID nach ensembl.org	Sequenz 5' - 3'		Amplifikat- Länge (bp)	Annealing- Temperatur (°C)
STAT3	ENST00000264657	Forward	GTGATGCTTCCCTGATTGTG	100	58
		Reverse	CAAGGAGTGGGTCTCTAGG		
MMP9-3	ENST00000372330	Forward	GCCACTACTGTGCCTTTGAG	113	60
		Reverse	TCGCCAGTACTTCCCATCCT		
CASP4	ENST00000444739	Forward	CTTTCTGCTCTTCAACGCC	144	57
		Reverse	AATGATTGCTGTACCTTCCGA		
TIMP1-2	ENST00000218388	Forward	CTGATGGTGGGTGGATGAG	163	60
		Reverse	TGGTGGGTTCTCTGGTGTC		
TIMP1-1	ENST00000218388	Forward	CTGTTGTTGCTGTGGCTG	183	58
		Reverse	GGAACCCTTTATACATCTTGGTC		
HPRT	*	Forward	ACGAAGTGTTGGATATAAGC	214	58
		Reverse	ATAATTTTACTGGCGATGTC		
PIAS3	ENST00000393045	Forward	GCAGCTAAGGTTCTGTCTC	241	58
		Reverse	AGTAATTCCGTCCGAATC		
HMBS-3	ENST00000278715	Forward	GAGAAGAATGAAGTGGACCTG	246	58
		Reverse	CCCGAATACTCCTGAACTCC		
MMP2	ENST00000219070	Forward	CGCCCATCATCAAGTTCC	298	58
		Reverse	GTAGCCAATGATCCTGTATGTG		
SOCS3-2	ENST00000330871	Forward	GGAGACTTCGATTCGGGA	385	58
		Reverse	GTTCTTGGTCCCAGACTG		
MMP9-1	ENST00000372330	Forward	GATCATTCTCAGTGCCG	393	58
		Reverse	GCCAGTACTTCCCATCCT		
MMP9-2	ENST00000372330	Forward	CAACTACGACACCGACGAC	407	58
		Reverse	AACAACTGTATCCTTGGTCC		
GP130-2	ENST00000381298	Forward	CTTAAACAAGCTCCACCTTCC	447	58
		Reverse	TATGACTCTTTGAAGGATCTGG		
GP130-1	ENST00000381298	Forward	GACTTTCAAGCTACTCACCC	459	58
		Reverse	AAGAATCCACATTCACAGCA		
H6PD	ENST00000377403	Forward	GCAGAGCACAAAGGATCAG	496	58
		Reverse	CGAATGACACCGTACTCC		
HMBS-1	*	Forward	TCACTCCTTGAAGGACCTG	500	58
		Reverse	TCAGGAAGGCCCTTTCAG		
GAPDH	ENST00000229239	Forward	AGTCAACGGATTTGGTCG	500	58
		Reverse	AGTCCTCCACGATACCA		

* Primer aus dem Labor für gynäkologische Molekularbiologie des Universitätsklinikums Jena (Prof. Dr. M. Dürst), mit freundlicher Genehmigung von Dr. Norman Häfner und Dr. Martina Schmitz.

4.1.7 Zelllinien

Tab. 7 **Verwendete Zelllinien.**

Name	Spezies	Typ
HTR-8/SVneo	human	Zelllinie aus Erst-Trimester-Trophoblastzellen, die mit dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 immortalisiert wurden
JAR	human	Zelllinie aus einem plazentaren Trophoblastzelltumor
JEG-3	human	Zelllinie aus der Hirnmetastase eines Trophoblastzelltumors

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Auftauen von Kryokonserven:

Um jederzeit auf Zellen gleichbleibend früher Passagen zurückgreifen zu können, wurden Zellen aller drei Zelllinien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Diese wurden für die Kultivierung zunächst bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Aufgrund der Toxizität des im Einfriermedium enthaltenen DMSO wurden sie zügig mit 5 ml des entsprechenden Kulturmediums gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Je $2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen wurden mit 15 ml Kulturmedium in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt. Alle Materialien und Lösungen wurden dabei, wenn nicht steril vom Hersteller geliefert, vor der Benutzung autoklaviert oder sterilfiltriert. Es wurde stets in der Sterilbank gearbeitet.

Kultivierung der Zelllinien:

Die Zelllinien wurden in 15 ml des entsprechenden Kulturmediums in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Diese wurden im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂-Anteil gelagert. Nach 2 bis 3 Tagen, bei einer Konfluenz von 90-100 %, wurden die Kulturen geteilt. Dazu wurden die Zellen in jeder Flasche mit 5 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Resuspension in frischem Kulturmedium wurde je ein Viertel oder ein Achtel der Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Dadurch erhöhte sich die Anzahl der Passagen um 2 bei einer Verdünnung von 1:4 und um 3 bei einer Verdünnung von 1:8, entsprechend der Anzahl nötiger Zellzahlverdopplungen bis zur erneuten vollständigen Konfluenz. Die dabei übrig bleibenden Zellen wurden als Kryokonserven oder Pellets eingefroren oder für die Stimulationsversuche verwendet.

Zellzahlbestimmung:

Um bei den Stimulationsversuchen eine vergleichbare Anzahl an Zellen einsetzen zu können, sowie um Kryokonserven gleicher Zellkonzentration anzulegen, war eine Bestimmung der Zellzahl notwendig. Dazu wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Zunächst wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl 0,04-prozentigem Trypanblau gemischt, um avitale Zellen anzufärben. 10 µl dieser gefärbten Zellsuspension wurden dann in die Kammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die ungefärbten, vitalen

Zellen in den 4 äußeren Quadranten gezählt. Aus den so erhaltenen 4 Werten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die so ermittelte Zahl entsprach der Anzahl Zellen in 0,1 µl Medium. Mit dem Faktor 10^4 erhielt man so die Zellzahl pro ml der Zellsuspension.

Anlegen von Kryokonserven:

Um Zellen früher Passagen für spätere Versuche zu konservieren, wurden regelmäßig Kryokonserven angelegt. Dazu wurden je ca. 2×10^6 Zellen für 3 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml des entsprechenden Einfriermediums resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Zunächst wurde dieses in einem isolierenden Behälter auf -80 °C gekühlt und konnte dann im flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden.

Einfrieren von Zellpellets:

Nicht stimulierte Zellen wurden zur späteren RNA-Isolation als Pellets von je 5×10^6 Zellen bei -80°C eingefroren. Dazu wurden sie zunächst in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Dann wurden je 5×10^6 Zellen bei 500 g zentrifugiert, in PBS resuspendiert und ein zweites Mal zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.2.2 Zellstimulation mit Zytokinen

Um die Regulation des JAK-STAT-Signalweges durch die ausgewählten Zytokine zu untersuchen, wurden die Zelllinien in Kultur mit den Zytokinen inkubiert. Zur Stimulation der Zellen wurden je 5×10^5 Zellen in 3 ml Kulturmedium in die Vertiefungen von 6-Well-Platten ausgesät und 8 bis 10 Stunden kultiviert. Dann wurde das Kulturmedium durch FKS-freies Medium ersetzt. Nach ca. 16 Stunden Hungerphase wurde jeweils mit 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml LIF oder 20 ng/ml Oncostatin M für 30 Minuten und 4 Stunden stimuliert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen durch Zugabe von 0,2 ml Lysepuffer aus dem *InnuPREP RNA Mini Kit* lysiert. Mit dem Lysat wurde entweder direkt im Anschluss eine RNA-Extraktion durchgeführt oder es wurde bis zur späteren RNA-Extraktion bei -80°C eingefroren.

4.2.3 Entwicklung neuer Primer

Die Entwicklung neuer Primer erfolgte mit dem Programm PerlPrimer intronüberspannend, um die RNA-Spezifität zu gewährleisten. Die Primer wurden mit einer Länge von 20-24 bp

und einer Schmelztemperatur von 60 °C entwickelt und mit den Programmen KineFold und UCSC in silico PCR auf Interaktionen und Spezifität überprüft. Die Bestellung erfolgte über die Firma Sigma Aldrich.

4.2.4 Extraktion der Gesamt-RNA

Bei der Extraktion der Gesamt-RNA aus stimulierten wie nicht stimulierten Zellen wurde nach der Anleitung zum *InnuPREP RNA Mini Kit* vorgegangen. Zur Elution der RNA aus der Säule wurden je 50 µl RNase-freies Wasser verwendet. Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit dem Photospektrometer *nanodrop ND 1000* ermittelt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C aufbewahrt.

4.2.5 Extraktion der genomischen DNA

Bei der Isolation von genomischer DNA (gDNA) wurde nach der Anleitung zum Kit *Quick-gDNATM MiniPrep* vorgegangen. Es wurden je 5×10^6 Zellen eingesetzt. Zur Elution der an die Säule gebundenen gDNA wurden 60µl Elutionspuffer verwendet. Die Konzentration wurde im Anschluss mit Hilfe des Photospektrometers *nanodrop ND 1000* bestimmt und die gDNA bei -20°C aufbewahrt.

4.2.6 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkription wurde die mRNA der gewonnenen Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde das Enzym *MaximaTM Reverse Transcriptase* verwendet und nach Tab. 1 vorgegangen. Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

4.2.7 Konventionelle Polymerasekettenreaktion

Bei der konventionellen Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden mit Hilfe genspezifischer Primer die zu analysierenden Abschnitte der synthetisierten cDNA vervielfältigt. Dafür wurde die *DreamTaqTM DNA Polymerase* genutzt. Entsprechend Tab. 2 wurden die Reaktionsansätze in 200 µl-Reaktionsgefäßen auf Eis vorbereitet. Im Thermocycler wurden die Proben dann nach folgendem Programm amplifiziert:

Tab. 8 **Programm für die konventionelle PCR** im *Mastercycler ep gradient S*.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)	Wiederholung
Initiale Denaturierung	5 min	95	1x
Denaturierung	10 sec	95	40x
Annealing	20 sec	58	
Elongation	30 sec	72	
Terminale Elongation	5 min	72	1x

Bei den PCR-Läufen zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur neuer Primer wurde ein Programm gewählt, bei dem im Heizblock ein Temperaturgradient für die Phase des Annealings erzeugt wurde. Dabei variierte die Temperatur in den 12 Reaktionsgefäßen einer Reihe von 47,9 °C bis 64,1 °C. Die PCR-Produkte wurden entweder sofort auf ein Agarosegel aufgetragen oder bis dahin bei -20°C aufbewahrt.

4.2.8 *Low-volume-RT-PCR*

Mit Hilfe des *AmpliSpeed slide cyclers ASC400D* ist es möglich, RT-PCR-Reaktionen in einem Volumen von 1 µl durchzuführen. In einem einschrittigen PCR-Protokoll wird dabei durch die Reverse Transkriptase mRNA in cDNA umgeschrieben und die cDNA in einer direkt im Anschluss durchgeführten PCR vervielfältigt. Dazu wurde das *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Reagenzien wie in Tab. 3 aufgeführt auf Eis gemischt. Die Primer wurden zuvor als Multiplex-Gemisch auf die hydrophilen Reaktionsringe der leeren *AmpliSlide*-Objektträger pipettiert und im *AmpliSpeed slide cycler* bei 58°C angetrocknet, bei der *Single-cell-PCR* wurden die einzelnen Zellen noch vor dem Auftragen der Primer aus einer PBS-Suspension mithilfe des Mikromanipulators in die Reaktionsringe abgelegt. Anschließend wurden pro Reaktionsring je 1 µl Reaktionsgemisch und sofort 5 µl *Sealing Solution* als Verdunstungsschutz aufgetragen. Bei jedem Stimulationsversuch wurde die RT-PCR in Sechsfachbestimmung mit drei Kontrollen ohne Template durchgeführt. Das Programm des Thermocyclers enthielt folgende Schritte:

Tab. 9 **Programm für die *Low-volume-RT-PCR*** im *AmpliSpeed slide cycler*.

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)	Wiederholung
Reverse Transkription	40 min	58	1x
Initiale Denaturierung	10 min	95	1x
Denaturierung	30 sec	94	45x
Annealing	75 sec	58	
Elongation	75 sec	72	
Terminale Elongation	10 min	72	1x

Die Reaktionsprodukte wurden entweder sofort auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bis dahin bei 4 °C gelagert.

4.2.9 Quantitative PCR (qPCR)

Mit dem *qTOWER* von Analytik Jena wurden die in der *Low-volume-RT-PCR* qualitativ ausgewerteten Stimulationsexperimente quantitativ untersucht. Durch Zugabe von *SYBR Green I*, einem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff, kann im Verlauf der PCR der Anstieg an doppelsträngiger DNA im Ansatz detektiert werden. Durch den Vergleich mit einer vorher erstellten Standardreihe ist eine Aussage über die in der Probe enthaltene DNA-Menge möglich, sodass Expressionsunterschiede besser als mit einer Endpunkt-PCR ausgewertet werden können. Dazu wurden zunächst Verdünnungsreihen aus aufgereinigten PCR-Produkten einer konventionellen PCR hergestellt. Zur Aufreinigung wurde das *InnuPREP PCRpure Kit* verwendet und anschließend die DNA-Konzentration mit Hilfe des Photospektrometers *nanodrop ND 1000* bestimmt. Mit diesem aufgereinigten PCR-Produkt wurde durch Verdünnung mit in nukleasefreiem Wasser gelöster Hefe-tRNA (50 ng/μl) eine Verdünnungsreihe hergestellt (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Moleküle/μl). Für die PCR wurde das *SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit* verwendet. Die Reaktionsansätze wurden nach Tab. 4 auf Eis vorbereitet und die PCR sowohl für die Standardkurven als auch für die eigentlichen Experimente nach folgendem Programm in Dreifachbestimmung durchgeführt:

Tab. 10 **Programm für die qPCR im *qTOWER*.**

Schritt	Zeit	Temperatur (°C)	Wiederholung
Initiale Denaturierung	2 min	95	1x
Denaturierung	5 sec	95	40x
Annealing	10 sec	58	
Elongation	10 sec	72	

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenbestimmung. Hierbei wurde das PCR-Produkt in Schritten von 6 Sekunden pro °C von 60 auf 95 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenz gemessen. Aus dem für das Amplifikat typischen Schmelzpunkt konnte so auf die Reinheit des PCR-Produktes geschlossen werden. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit den Programmen *qPCRsoft 1.0* von Analytik Jena und *REST 2009* von Qiagen, wobei als Einstellungen eine Baseline von 3-12 und ein Treshold von 8,3 übernommen wurden.

4.2.10 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden die zu analysierenden Makromoleküle in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt. An der Kathode aufgetragen, wandern die negativ geladenen (Deoxy-)Ribonukleinsäuren zur Anode. Dabei bewegen sich Amplifikate mit weniger Basenpaaren schneller als Amplifikate mit mehr Basenpaaren.

4.2.10.1 *Agarosegelelektrophorese*

Bei der Agarosegelelektrophorese werden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und in diesem aufgetrennt. Es wurde ein zweiprozentiges Agarosegel verwendet, wofür 2 g Agarose in 100 ml TAE aufgekocht und 5 µl des Detektionsfarbstoffes *Red Safe Nucleic Acid Staining Solution* zugegeben wurden. Nach Erstarren des Gels wurde die horizontale Gelelektrophoresekammer mit TAE befüllt. Die mit *Orange DNA Loading Dye* versetzten Amplifikatproben wurden dann in die Taschen des Gels pipettiert. Als Größenmarker wurde die *O'Gene RulerTM 50 bp DNA ladder* verwendet. Die Proben wurden bei 90 V aufgetrennt und die Banden unter UV-Beleuchtung im *MF chemiBIS 3.2* detektiert.

4.2.10.2 *Polyacrylamidgelelektrophorese*

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde ein Polyacrylamidgel gemäß den Mengenangaben in Tab. 5 in der vertikalen Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde TBE als Puffer hinzugefügt und die noch auf dem Objektträger mit *Orange DNA Loading Dye* versetzten Amplifikatproben sowie die *O'Gene RulerTM 50 bp DNA ladder* wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Bei 25 mA pro Gel wurden die Proben aufgetrennt. Die Banden wurden dann mit der Silberfärbung (An et al. 2009) visualisiert und mit dem Scanner dokumentiert.

5 Ergebnisse

5.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Um die Genexpression der Zelllinien HTR-8/SVneo, JAR und JEG-3 in Abhängigkeit von der Stimulation mit Zytokinen untersuchen zu können, musste zunächst ein zuverlässiges PCR-Verfahren etabliert werden. Dazu wurden im Labor bereits vorhandene Primer an den Zelllinien überprüft und neue Primer entwickelt. Zunächst wurde die optimale Annealingtemperatur für jeden der vorhandenen und zuvor bereits an HTR-8/SVneo- und JEG-3-Zellen getesteten Primer an JAR-cDNA ermittelt. Sie betrug für alle Primer ca. 57-60°C (als Beispiel das Primerpaar GP130-1 in Abb. 5). Diese Werte wurden auch für HTR-8/SVneo- und JEG-3-Zellen ermittelt, so dass für die späteren PCRs 58°C als Annealingtemperatur festgelegt wurde.

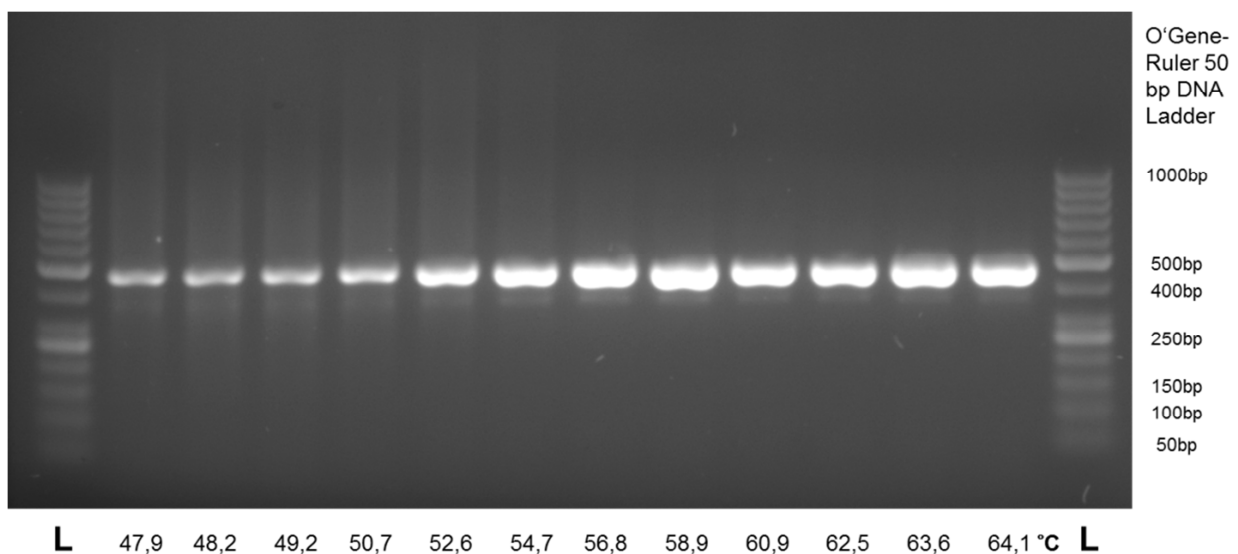


Abb. 5 **Agarosegel einer Temperaturgradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur für das Primerpaar GP130-1 (Amplifikatlänge 459 bp) an JAR-cDNA.** Die Annealingtemperaturen betrugen 47,9 bis 64,1 °C. Ab einer Temperatur von 52,6°C zeigen sich kräftige Banden, so dass GP130-1 bei einer Annealingtemperatur von 58°C eingesetzt werden kann.

Anschließend wurden die Primer mittels konventioneller PCR an c- und gDNA aller verwendeten Zelllinien auf Qualität und Genspezifität überprüft (abgebildet als Beispiel die Überprüfung aller Primer an JAR-c- und -gDNA in Abb. 6, Abb. 7 und Abb. 8).

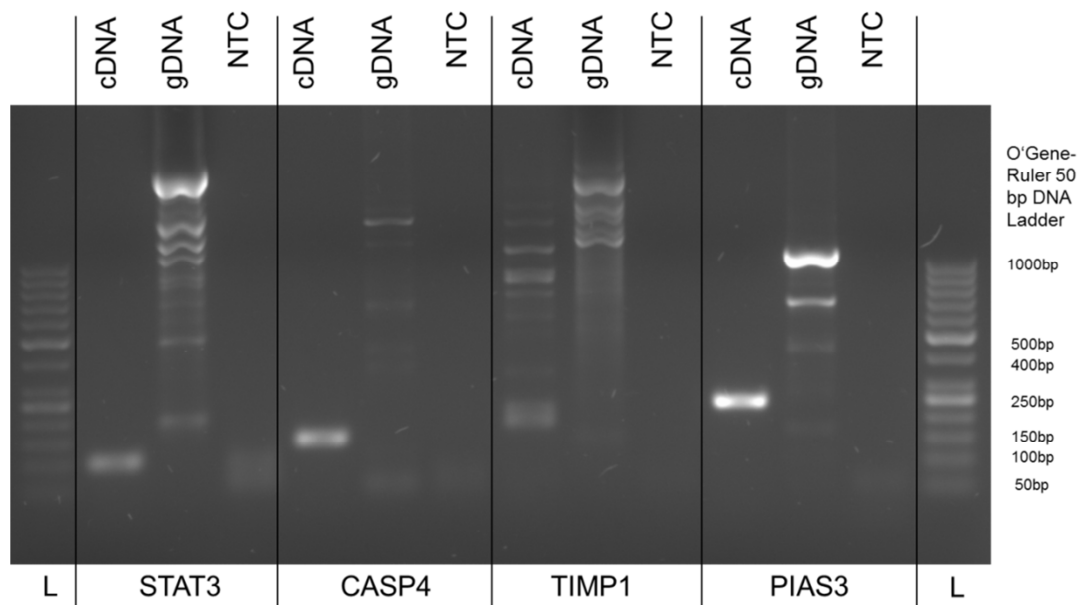


Abb. 6 **Agarosegel einer konventionellen PCR mit den Primerpaaren STAT3** (Amplifikatlänge 100 bp), **CASP4** (Amplifikatlänge 144 bp), **TIMP1** (Amplifikatlänge 183 bp) **und PIAS3** (Amplifikatlänge 241 bp) **sowie c- und gDNA von JAR-Zellen.** Es handelt sich um einen Primer-Spezifitätstest. Alle Primer erzeugten hierbei auch Produkte in der gDNA-PCR, bei TIMP1 zeigen sich unspezifische Banden in der cDNA-PCR.

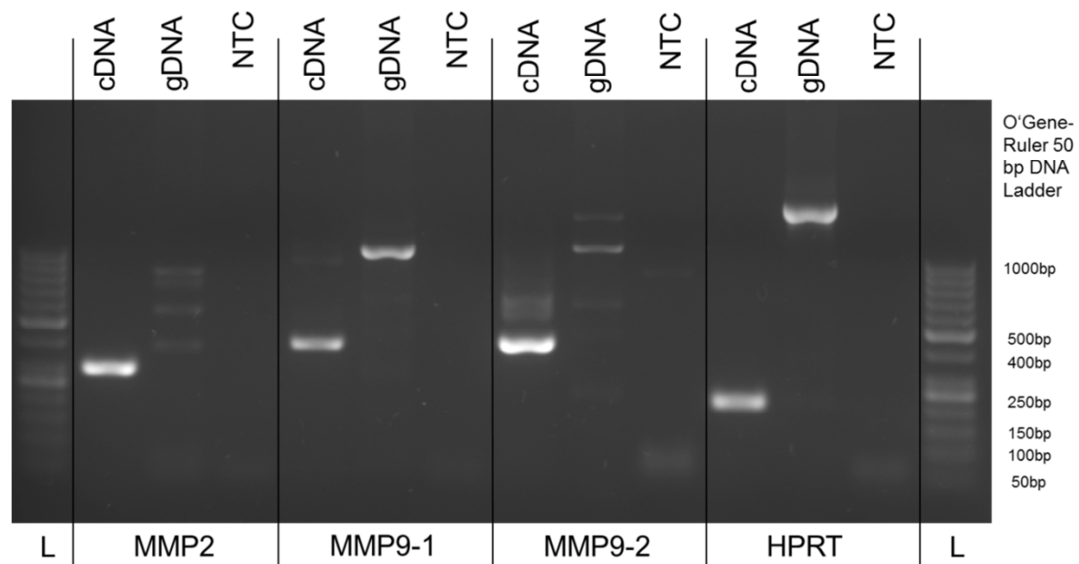


Abb. 7 **Agarosegel einer konventionellen PCR mit den Primerpaaren MMP2** (Amplifikatlänge 298 bp), **MMP9-1** (Amplifikatlänge 393 bp), **MMP9-2** (Amplifikatlänge 407 bp) **und HPRT** (Amplifikatlänge 214 bp) **sowie c- und gDNA von JAR-Zellen.** Es handelt sich um einen Primer-Spezifitätstest. Alle Primer erzeugten hierbei auch Produkte in der gDNA-PCR, bei MMP9-2 zeigen sich unspezifische Banden in der cDNA-PCR.

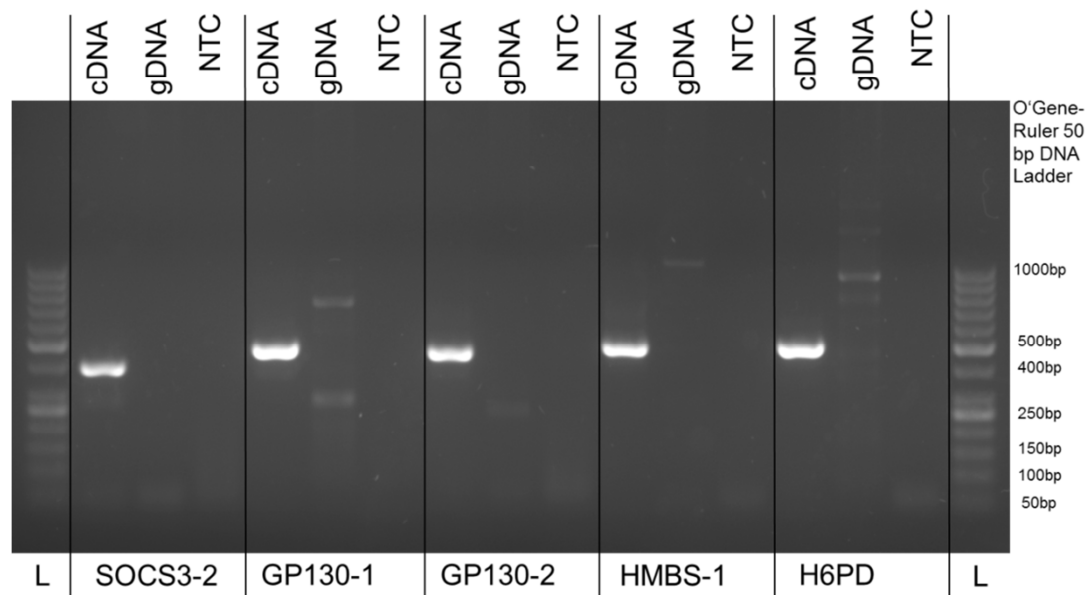


Abb. 8 **Agarosegel einer konventionellen PCR mit den Primerpaaren SOCS3-2** (Amplifikatlänge 385 bp), **GP130-1** (Amplifikatlänge 459 bp), **GP130-2** (Amplifikatlänge 447 bp), **HMBS-1** (Amplifikatlänge 500 bp) und **H6PD** (Amplifikatlänge 496 bp) sowie **c- und gDNA von JAR-Zellen**. Es handelt sich um einen Primer-Spezifitätstest. Alle Primer bis auf SOCS3-2 erzeugten hierbei auch Produkte in der gDNA-PCR, bei keinem der Primer zeigen sich unspezifische Banden in der cDNA-PCR.

Dabei zeigten sich in den Versuchen mit allen drei Zelllinien unspezifische Banden in der gDNA-PCR. Um in den Stimulationsexperimenten keine unspezifischen Banden durch gDNA-Kontamination der Proben zu erhalten, wurde als Konsequenz ein DNase-Verdau-Schritt in die RNA-Extraktion eingeführt. Aufgrund der beim Primerpaar TIMP1 auch in der cDNA-PCR auftretenden unspezifischen Banden (Abb. 6) musste für TIMP1 ein neues Primerpaar entwickelt werden und für MMP9-1 und -2 (Abb. 7) machten inkonsistente Ergebnisse zwischen den verschiedenen Zelllinien und Versuchen die Entwicklung eines neuen Primerpaares nötig. Das Primerpaar für das Referenzgen HMBS (Abb. 8) bildet ein Amplifikat mit einer für die geplanten *Low-volume*- und qPCRs zu großen Länge, denn diese sollte 250 bp nicht überschreiten.

Folglich wurden für TIMP1, MMP9 und HMBS neue Primer entwickelt. Auch für diese (benannt als TIMP1-2, MMP9-3 und HMBS-3) wurde mittels konventioneller Temperaturgradienten-PCR jeweils an HTR-8/SVneo-, JEG-3- und JAR-cDNA die optimale Annealingtemperatur bestimmt. Sie lag für alle Primerpaare bei ca. 58-60°C (als Beispiel das Primerpaar HMBS-3 an JAR-cDNA in Abb. 9).

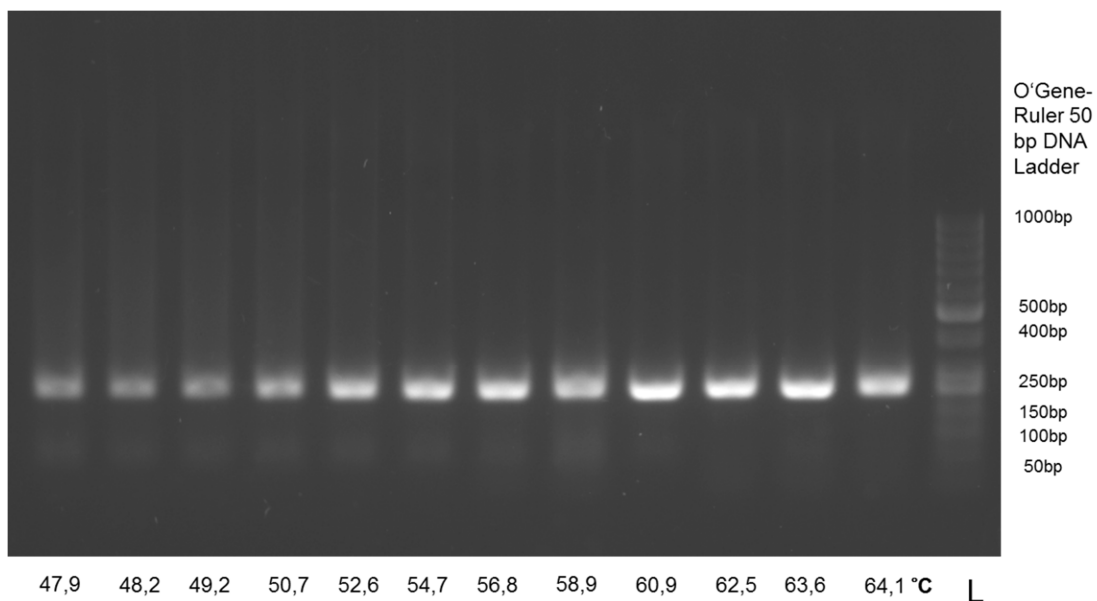


Abb. 9 **Agarosegel einer Temperaturgradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur für das Primerpaar HMBS-3 (Amplifikatlänge 246 bp) an JAR-cDNA.** Die Annealingtemperaturen betrugen 47,9 bis 64,1 °C. Ab einer Temperatur von 52,6°C zeigen sich kräftige Banden, so dass HMBS-3 bei einer Annealingtemperatur von 58°C eingesetzt werden kann.

Anschließend wurden die neuen Primer in konventioneller PCR mit c- und gDNA aller drei Zelllinien auf Ihre Qualität und Genspezifität überprüft (als Beispiel an JAR-c- und -gDNA in Abb. 10).

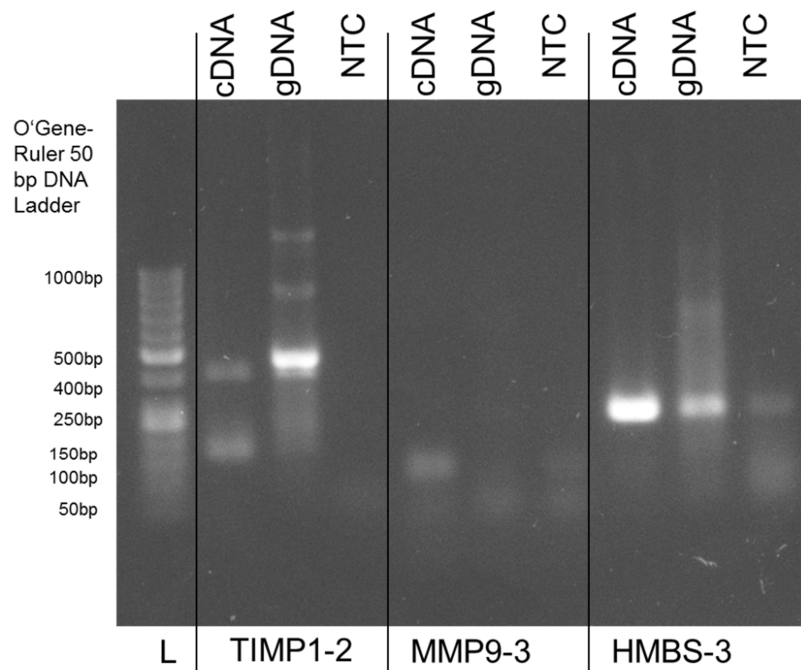


Abb. 10 **Agarosegel einer konventionellen PCR mit den Primerpaaren TIMP1-2** (Amplifikatlänge 163 bp), **MMP9-3** (Amplifikatlänge 113 bp) **und HMBS-3** (Amplifikatlänge 246 bp) **sowie c- und gDNA von JAR-Zellen.** Es handelt sich um einen Primer-Spezifitätstest. Die Primer erzeugten hierbei auch Produkte in der gDNA-PCR, bei TIMP1-2 zeigen sich unspezifische Banden in der cDNA-PCR.

Dabei traten auch mit dem neuen Primerpaar TIMP1-2 unspezifische Banden in der cDNA-PCR auf. MMP9-3 und HMBS-3 zeigten in den Versuchen mit allen drei Zelllinien je eine spezifische Bande. Die Bande von MMP9-3 ist schwächer als die für HMBS, was möglicherweise am geringeren Expressionslevel von MMP9 gegenüber HMBS als Referenzgen liegt. Die unspezifischen Banden in der gDNA traten wie in den Versuchen mit den bereits vorhandenen Primern auf und bestätigten die Notwendigkeit der Einführung eines DNase-Verdau-Schrittes in die RNA-Extraktion. Durch diesen Schritt konnten die unspezifischen Banden auch effektiv beseitigt werden. So zeigte sich in der Kontrolle ohne reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese (-RT) nachfolgender Versuche keine Verunreinigung mehr (siehe Abb. 11).

Für die schnelle Gewinnung vieler Daten aus geringen Probenmengen der Stimulationsexperimente sollten die Primerpaare in einem Multiplex-Ansatz verwendbar sein. Aufgrund der in den oben beschriebenen Experimenten ermittelten Eigenschaften der zur Verfügung stehenden und der neu entwickelten Primer wurden für den

Multiplexansatz HMBS-3 als Primer eines Referenzgens, STAT3, CASP4, PIAS3, MMP2, MMP9-3 und SOCS3-2 verwendet. Das neu entwickelte Primerpaar TIMP1-2 (Abb. 10) wurde aufgrund unspezifischer Banden und inkonsistenter Ergebnisse in den Versuchen mit allen drei Zelllinien nicht weiter verwendet.

5.2 Einfluss der Zytokine auf die Genexpression in den Zelllinien

5.2.1 Konventionelle PCR

Da die Literaturrecherche sowie Ergebnisse aus dem Labor starke Hinweise dafür lieferten, dass GM-CSF, LIF und Oncostatin M die Invasivität von Trophoblasten beeinflussen, wurde die Expression invasivitätsassoziierter Gene nach Stimulation der Zelllinien mithilfe der PCR untersucht.

Die Zelllinien HTR-8/SVneo, JEG-3 und JAR wurden 30 Minuten und 4 Stunden mit den Zytokinen GM-CSF, LIF und Oncostatin M stimuliert. Die RNA wurde extrahiert und durch die reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde zunächst in der konventionellen PCR mit den Primern HMBS-3, STAT3, CASP4, PIAS3, MMP2, MMP9-3 und SOCS3-2 im Duplex- und Multiplexansatz auf die veränderte Expression dieser Gene untersucht (als Beispiel nicht stimulierte und 30 Minuten mit LIF stimulierte JEG-3-Zellen in Abb. 11 und Abb. 12).

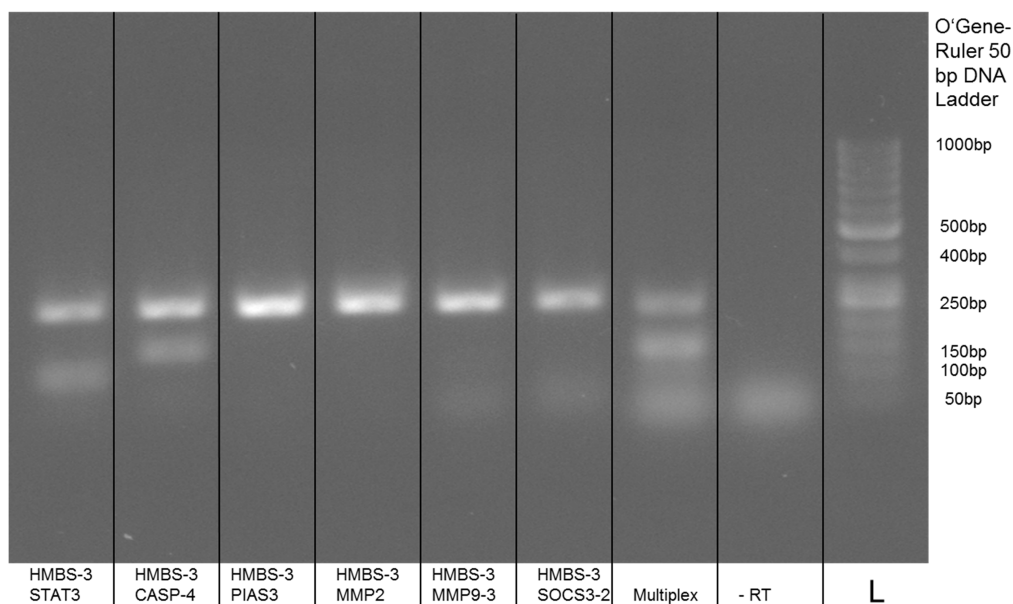


Abb. 11 **Agarosegel einer konventionellen PCR mit cDNA nicht stimulierter JEG-3-Zellen und den Primerpaaren HMBS-3, STAT3, CASP4, PIAS3, MMP2, MMP9-3 und SOCS3-2.** Die Primerpaare wurden in Duplex- sowie Multiplexansätzen verwendet. Rechts eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese (-RT, mit Primer-Multiplexansatz).

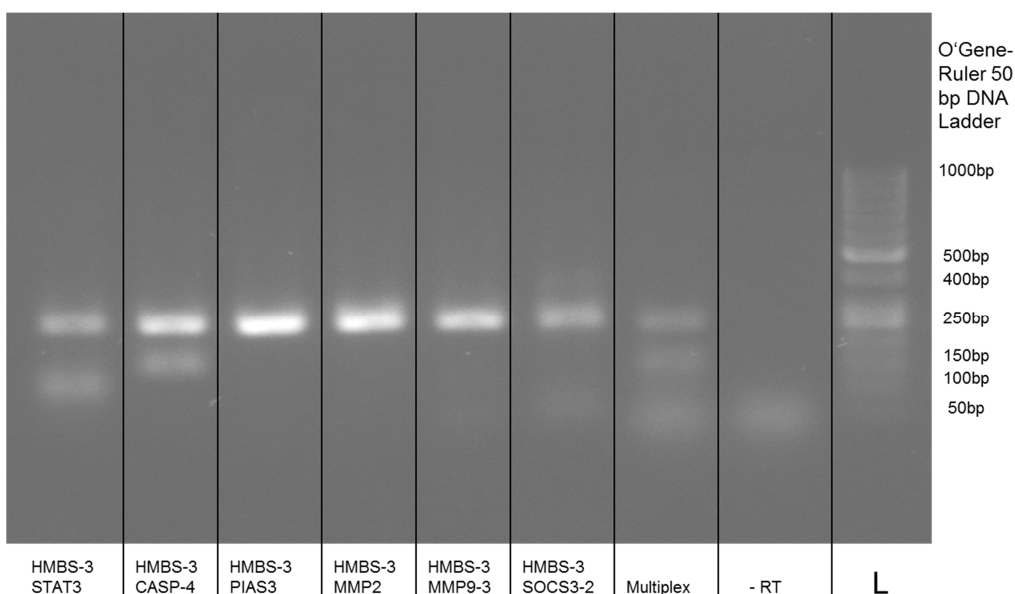


Abb. 12 **Agarosegel einer konventionellen PCR mit cDNA stimulierter JEG-3-Zellen (30 Minuten LIF) und den Primerpaaren HMBS-3, STAT3, CASP4, PIAS3, MMP2, MMP9-3 und SOCS3-2.** Die Primerpaare wurden in Duplex- sowie Multiplexansätzen verwendet. Rechts eine Kontrolle ohne reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese (-RT, mit Primer-Multiplexansatz).

In diesen Experimenten zeigte sich die begrenzte Sensitivität der konventionellen PCR und der Detektionsmethode. Die PCR-Produkte einiger Primerpaare sind in den Gelen nicht zu detektieren und Unterschiede zwischen nicht stimulierten und stimulierten Zellen sind auch in den hier nicht abgebildeten Versuchen mit HTR-8/SVneo- und JAR-Zellen nicht zu erkennen. Deshalb wurden die Versuche nun mit der *Low-volume-PCR* im *AmpliSpeed slide cycler ASC400D* fortgesetzt.

5.2.2 Low-volume-RT-PCR

Aufgrund der ungenügenden Sensitivität der konventionellen PCR für die Analyse der Genexpression in den stimulierten Zelllinien wurde die *Low-volume-RT-PCR* im *AmpliSpeed slide cycler ASC400D* mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung erprobt. Dazu wurde zunächst RNA nicht stimulierter Zellen aller drei Zelllinien mit den Primerpaaren SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, PIAS3, CASP4, MMP9-3 und STAT3 als Multiplexansatz eingesetzt (Abb. 13).



Abb. 13 **Polyacrylamidgel nach Silberfärbung mit den Produkten einer *Low-volume-RT-PCR* mit RNA von JAR-, JEG-3- und HTR-8/SVneo-Zellen und den Primern SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, PIAS3, CASP4, MMP9-3 und STAT3 als Multiplexansatz.** Jeweils Dreifachbestimmung mit drei Negativkontrollen (NTC). Die Banden aller Primer bis auf SOCS3-2 sind deutlich zu erkennen; in den Negativkontrollen treten auch Banden auf.

Hierbei waren im Gegensatz zur konventionellen PCR bis auf SOCS3-2 die Banden der Amplifikate aller eingesetzten Primerpaare deutlich zu erkennen. Allerdings zeigte sich

auch eine starke Verunreinigung der Negativkontrollen. Diese ist zum einen auf die hohe Sensitivität des Systems, das einzelne Kopien eines Genes nachweisen kann, zurückzuführen. Zum anderen gab es eine Vielzahl an Kontaminationsmöglichkeiten. So sind die Reaktionsringe auf dem *AmpliSlide*-Objektträger nicht abgeschlossen; Aerosole können leicht entstehen und andere Reaktionsringe kontaminieren. Außerdem konnte durch die fehlende räumliche Trennung von Prä- und Post-PCR-Bereich schon die Produktkonzentration in der Raumluft die Reaktionsringe verunreinigen. Es wurde daher das Pipettieren der PCR an anderen Plätzen im Labor erprobt, was aber vermutlich aufgrund der erstgenannten Kontaminationsmöglichkeiten keine großen Verbesserungen zur Folge hatte.

5.2.2.1 HTR-8/SVneo

Die mit GM-CSF, LIF und Oncostatin M je 30 Minuten und 4 Stunden stimulierten HTR-8/SVneo-Zellen wurden mit der *Low-volume-RT-PCR* auf die Expression der Gene SOCS3, MMP2, PIAS3, CASP4, MMP9 und STAT3 untersucht. Als Referenzgen diente dabei HMBS (Abb. 14).

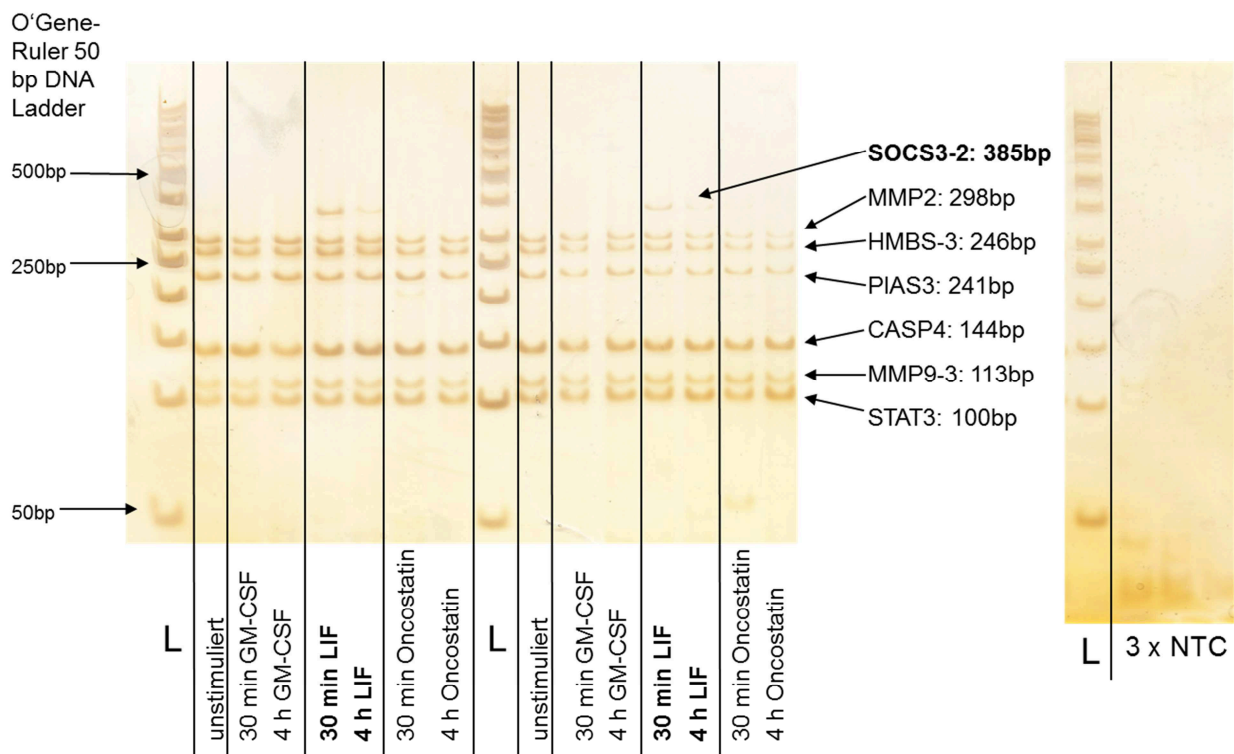


Abb. 14 **Polyacrylamidgel nach Silberfärbung mit den Produkten einer *Low-volume-RT-PCR* mit RNA von stimulierten HTR-8/SVneo-Zellen und den Primern SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, PIAS3, CASP4, MMP9-3 und STAT3 als Multiplexansatz.** Links zwei der insgesamt sechs parallel durchgeführten Bestimmungen, rechts die drei Negativkontrollen desselben PCR-Laufes. Die Banden aller untersuchten Gene sind stimulationunabhängig gleich stark zu erkennen; nur die Bande von SOCS3 tritt einzig nach LIF-Stimulation auf.

Während die Banden für MMP2, PIAS3, CASP4, MMP9 und STAT3 keine stimulationsabhängigen Intensitätsunterschiede zeigen, ist für SOCS3 ein deutlicher Intensitätsanstieg nach Stimulation mit LIF zu erkennen. Dabei ist die Bande 30 Minuten nach der Stimulation am stärksten und 4 Stunden nach der Stimulation schwach zu erkennen. Bei Einsatz von RNA nicht stimulierter Zellen sowie nach Stimulation mit GM-CSF und Oncostatin M ist keine Bande für SOCS3 sichtbar. Dieses Ergebnis ließ sich auch in drei voneinander unabhängigen Wiederholungen des Versuches reproduzieren und deutet auf die erhöhte Expression von SOCS3 in HTR-8/SVneo-Zellen nach Stimulation mit LIF hin.

5.2.2.2 JEG-3

RNA stimulierter JEG-3-Zellen wurde analog der RNA der HTR-8/SVneo-Zellen (Kapitel 5.2.2.1) mit der *Low-volume-PCR* auf stimulationsabhängige Änderungen der Genexpression untersucht (Abb. 15).

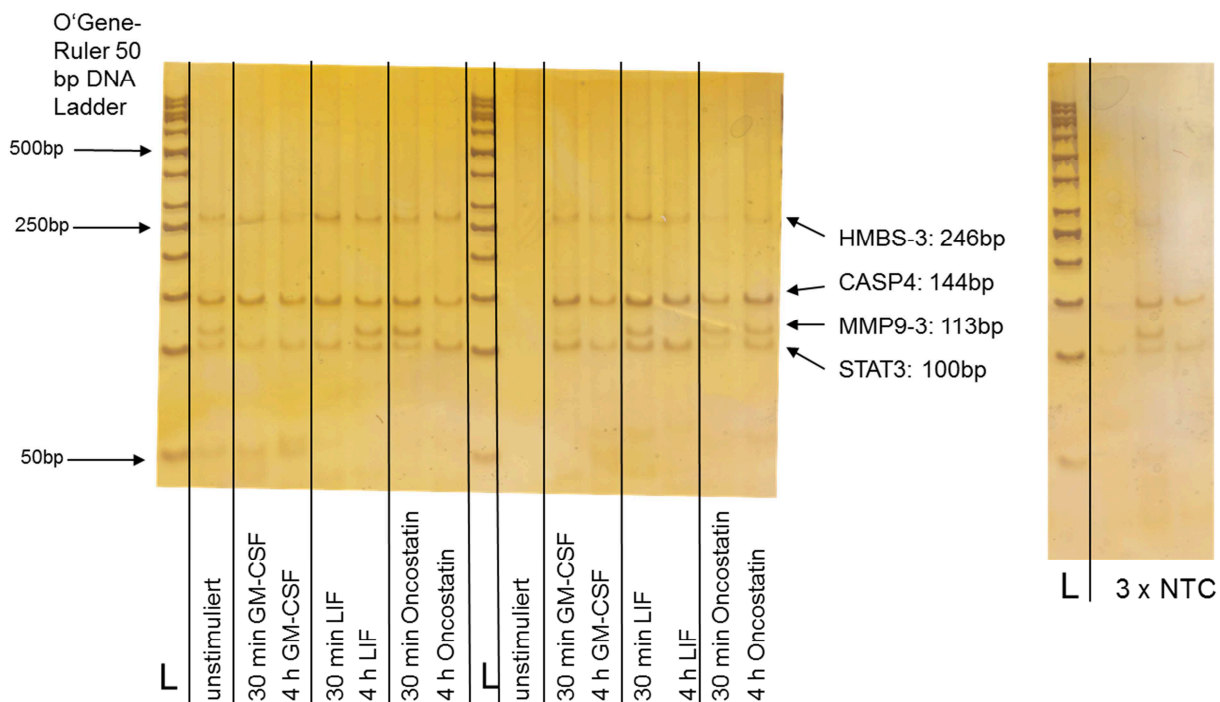


Abb. 15 **Polyacrylamidgel nach Silberfärbung mit den Produkten einer *Low-volume-RT-PCR* mit RNA von stimulierten JEG-3-Zellen und den Primern SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, PIAS3, CASP4, MMP9-3 und STAT3 als Multiplexansatz.** Links zwei der insgesamt sechs parallel durchgeführten Bestimmungen, rechts die drei Negativkontrollen desselben PCR-Laufes. Die Negativkontrollen sind kontaminiert; die Banden der untersuchten Gene treten unregelmäßig auf.

Im Gegensatz zu den HTR-8/SVneo-Zellen zeigten sich bei den JEG-3-Zellen allerdings in vier voneinander unabhängigen Versuchen keine stimulationsabhängigen Expressionsunterschiede. Die Banden von SOCS3, PIAS3 und MMP2 waren jeweils nur schwach bis gar nicht zu erkennen. Diese Gene scheinen also bei JEG-3-Zellen nur schwach exprimiert zu werden. Die Regulation der anderen Gene (CASP4, MMP9 und STAT3) mag auch deshalb nicht erkennbar sein, da es sich bei der *Low-Volume-RT-PCR* um eine Endpunkt-PCR handelt, bei der geringe Unterschiede in der Ausgangs-Nukleinsäuremenge nach der Amplifizierung nicht mehr zu unterscheiden sind. Auf die Kontamination der Negativkontrollen wurde bereits in Kapitel 5.2.2 eingegangen.

5.2.2.3 JAR

Auch die mit GM-CSF, LIF und Oncostatin M stimulierten JAR-Zellen wurden analog zu den HTR-8/SVneo-Zellen (Kapitel 5.2.2.1) mit der *Low-volume-RT-PCR* auf ihre Genexpression untersucht (Abb. 16).

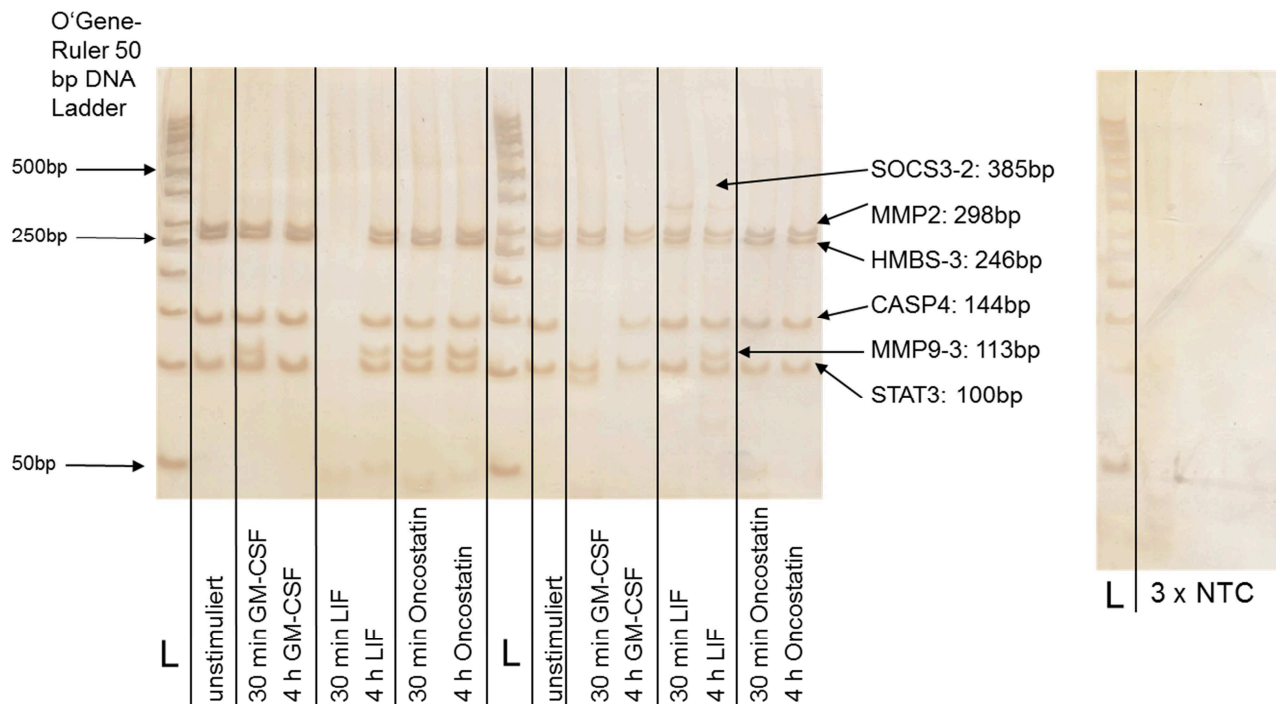


Abb. 16 **Polyacrylamidgel nach Silberfärbung mit den Produkten einer *Low-volume-RT-PCR* mit RNA von stimulierten JAR-Zellen und den Primern SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, PIAS3, CASP4, MMP9-3 und STAT3 als Multiplexansatz.** Links zwei der insgesamt sechs parallel durchgeführten Bestimmungen, rechts die drei Negativkontrollen desselben PCR-Laufes. Die Banden von SOCS3-2, CASP4 und MMP9-3 treten unregelmäßig auf. Die Bande von PIAS3 fehlt.

Es zeigte sich auch bei drei voneinander unabhängigen Wiederholungen des Versuches keine stimulationabhängige Expressionsänderung der Gene. Die Bande von PIAS3 zeigte sich in keinem der Versuche. SOCS3 zeigte einmalig eine schwache Bande nach Stimulation mit LIF, dieses Ergebnis ließ sich aber in wiederholten Versuchen nicht bestätigen. Alle anderen Banden hatten nach Stimulation eine gleichbleibend stark erscheinende Intensität oder zeigten Intensitätsänderungen ohne erkennbaren Zusammenhang zur Stimulation, was wie bei den JEG-3-Zellen (Kapitel 5.2.2.2) vermuten lässt, dass eventuell vorhandene Unterschiede im Expressionsgrad in der *Low-Volume-RT-PCR* als Endpunkt-PCR nicht erkennbar sind. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu

den bereits erläuterten PCR-Verfahren die im Folgenden beschriebenen qPCR-Versuche durchgeführt.

5.2.3 Single-cell-PCR

Um die möglicherweise voneinander abweichenden Genexpressionsmuster einzelner Zellen innerhalb eines Pools zu untersuchen, wurden einzelne Zellen mit dem Mikromanipulator auf die *Slides* des *AmpliSpeed slide cyclor ASC400D* übertragen und durch RT-PCR mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung untersucht. Zunächst wurden probeweise nicht stimulierte JEG-3-Zellen eingesetzt (Abb. 17).

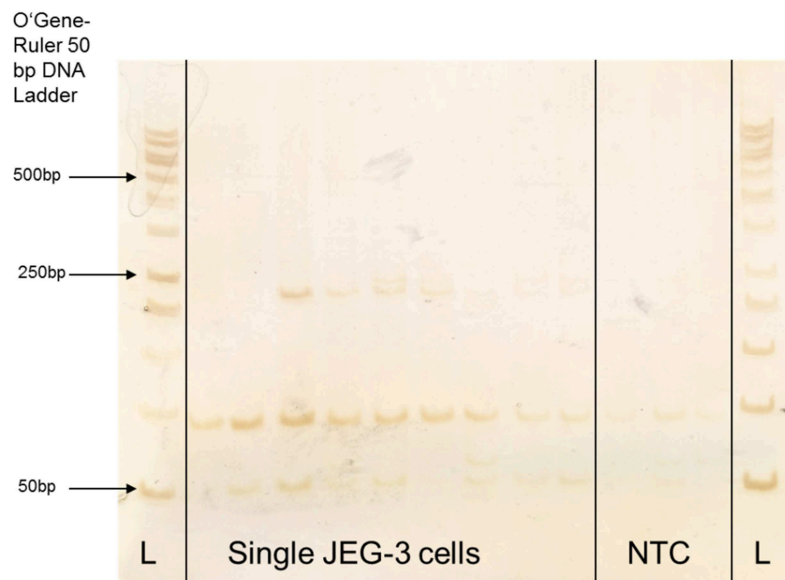


Abb. 17 **Polyacrylamidgel nach Silberfärbung mit den Produkten einer *Single-cell-PCR* mit nicht stimulierten JEG-3-Zellen und den Primern SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, PIAS3, CASP4, MMP9-3 und STAT3 als Multiplexansatz.** Links neun einzeln aufgetragene Zellen (Single JEG-3 cells), rechts die drei Negativkontrollen desselben PCR-Laufes (NTC). Die Banden von PIAS3 und STAT3 treten unregelmäßig auf, SOCS3-2, MMP2, HMBS-3, CASP4 und MMP9-3 fehlen.

Hier zeigten sich ein diffuses Expressionsmuster und häufig kontaminierte Negativkontrollen. Über die möglichen Kontaminationsursachen wurde bereits in Kapitel 5.2.2 berichtet. Inkonsistente Ergebnisse traten auch bei den *Single-cell*-Versuchen von Jana Pastuschek (Pastuschek 2012) und Sebastian Grosse (Grosse 2014) auf. So zeigte sich beispielsweise, dass das für die Arbeit mit dem Mikromanipulator verwendete Lösungsmittel PBS vermutlich durch beschädigte Zellen selbst schon solche Mengen RNA

enthielt, dass es allein aufgetragen zu Banden führte, die den Proben mit enthaltener Zelle sehr ähnelten. Aus diesen Gründen wurde die *Single-cell-PCR* nicht weitergeführt.

5.2.4 qPCR

In Ergänzung zu den konventionellen PCR-Versuchen sollte die quantitative PCR (qPCR) durchgeführt werden, um die mit der Endpunkt-PCR eventuell methodenbedingt nicht nachweisbaren Expressionsunterschiede zu detektieren. Bei der qPCR wird die Entwicklung der Amplifikatmenge über die PCR-Zyklen hinweg beobachtet, so dass Proben untereinander vergleichbar sind, die bei einer Endpunkt-PCR anhand der Banden in der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese nicht unterscheidbar wären.

Zur Ermittlung der PCR-Effizienz und späteren Quantifizierung wurden zunächst Verdünnungsreihen (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Moleküle) aus aufgereinigtem PCR-Produkt erstellt. Dabei handelte es sich um HMBS-3 für das Referenzgen, PIAS3, CASP4, SOCS3-2, TIMP1-2 und MMP9-3. Diese Primer waren aufgrund ihrer geringen Amplifikatgröße ausgewählt worden, die bei der qPCR von Vorteil ist. In Dreifachbestimmung aus jeder der Verdünnungen wurde dann mit jeweils einem der 6 Primerpaare ein erster PCR-Versuch durchgeführt. Als Beispiel die PCR der Verdünnungsreihe des Referenzgens HMBS in Abb. 18.

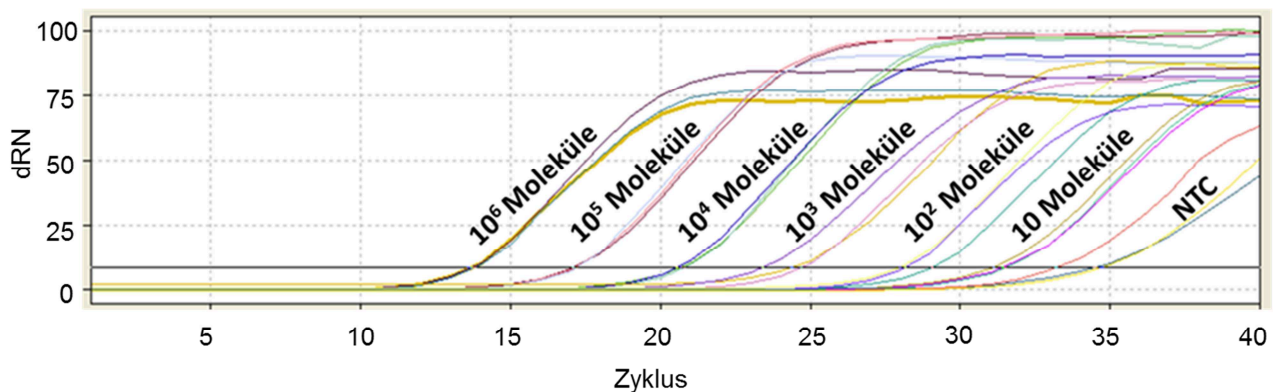


Abb. 18 **Verdünnungsreihen-PCR mit dem Primerpaar HMBS-3.** Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Eingesetzt wurden 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10 Moleküle HMBS-3-Amplifikat. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven, die den 3 Probenansätzen mit jeweils gleicher Molekülzahl entsprechen. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3 und erlaubt so die Ermittlung von Ct-Werten für die einzelnen Verdünnungen. Die Ct-Werte der Negativkontrollen liegen im Durchschnitt nur um 3 Zyklen höher als die der letzten HMBS-3-Amplifikat-Verdünnung. Dies spricht für eine relevante Kontamination der Proben von mehreren Molekülen.

Als Effizienzen wurden hierbei bestimmt:

HMBS-3: 90,4%

PIAS3: 99,0%

CASP4: 91,3%

SOCS3-2: 92,1%

Eine Effizienz von 100% entspricht einer Amplifikatverdoppelung in jedem Zyklus. Effizienzen zwischen 90 und 100% gelten daher als Indikatoren für die Qualität und gute Reproduzierbarkeit eines Versuches (Dorak 2006). Dieser Wertebereich wurde für diese 4 Verdünnungsreihen eingehalten. Die Verdünnungsreihen von TIMP1-2 und MMP9-3 zeigten auch bei Wiederholung eine so große Kontamination, dass mit diesen Primern nicht weitergearbeitet wurde. Hier wird also bereits deutlich, dass bei der qPCR - wie auch schon bei der *Low-Volume-RT-PCR* - ein relevantes Kontaminationsproblem vorlag, das auch in wiederholten Versuchen nicht vollständig gelöst werden konnte.

Es wurde die cDNA der drei Zelllinien HTR-8/SVneo, JEG-3 und JAR, die jeweils 30 Minuten und 4 Stunden vor der RNA-Isolation (beziehungsweise dem Lysieren und

Einfrieren) mit LIF stimuliert worden waren, eingesetzt. Die Verwendung eines Primer-Multiplexansatzes ist bei diesem Versuch nicht möglich, so dass Reaktionsansätze jeweils mit den einzelnen Primerpaaren HMBS-3 für das Referenzgen HMBS, PIAS3, CASP4, und SOCS3-2 vorbereitet wurden. Die Versuche wurden auch hier inklusive der Negativkontrolle für jedes Primerpaar in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Wie bereits bei der Effizienzbestimmung erkennbar, zeigten die Negativkontrollen dabei zum Teil große Verunreinigungen in Form niedriger Ct-Werte. In der Schmelzkurvenanalyse konnte zudem gezeigt werden, dass es sich dabei nicht nur um Primerdimere, sondern auch um echte PCR-Amplifikate handelte. Trotz Wiederholung in unterschiedlichen Räumen des Labors blieben vor allem für das Gen SOCS3 Kontaminationen bestehen, die im Bereich der in den eigentlichen Proben gemessenen Konzentrationen lagen (Abb. 19). Ein Grund dafür bestand auch darin, dass die Konzentrationen von SOCS3 in den Proben - wie schon in Kapitel 5.2.2.1 gezeigt – zudem sehr gering waren, so dass sie kaum über den in den Negativkontrollen gemessenen Konzentrationen lagen. Somit konnte keiner der Versuche mit SOCS3 ausgewertet werden.

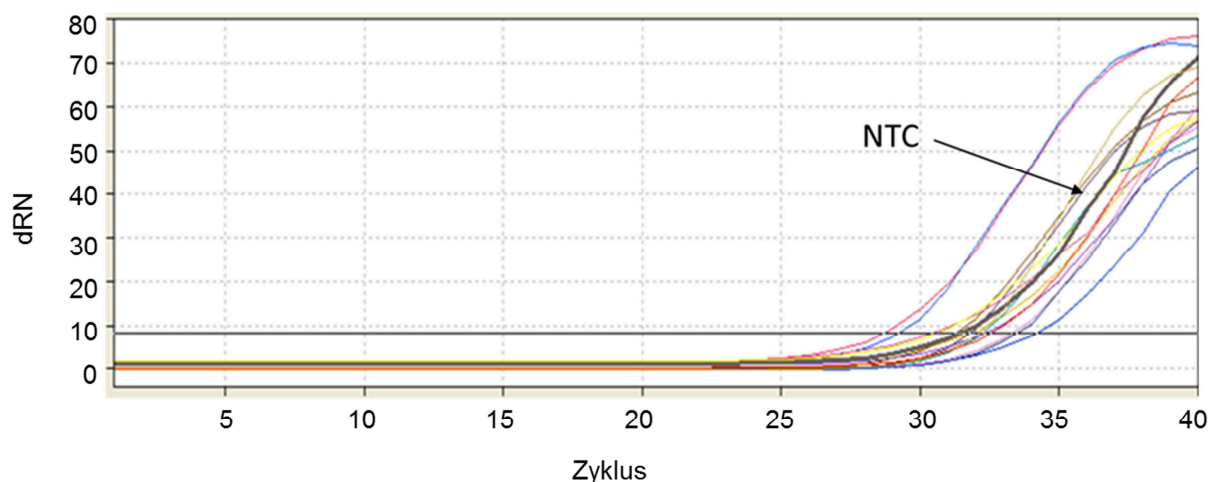


Abb. 19 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JAR-Zellen und dem Primerpaar SOCS3-2.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Eingesetzt wurden jeweils in Dreifachbestimmung cDNA nicht stimulierter Zellen, 30 Minuten und 4 Stunden LIF-stimulierter Zellen, zudem Negativkontrollen und Reverse-Transkriptase-freie Kontrollen. Die Negativkontrollen liegen inmitten der Proben (eine davon fett und markiert mit NTC); es ist also von einer erheblichen Kontamination auszugehen, die im Bereich der in den eigentlichen Proben gemessenen cDNA-Konzentrationen liegt.

Es können jedoch unter Vorbehalt qPCR-Ergebnisse mit kontaminierten Negativkontrollen ausgewertet werden, wenn eine ausreichende Anzahl an Amplifikationszyklen zwischen den Ct-Werten der Proben und denen der Negativkontrollen liegen (Bustin und Nolan 2004). Die exakte Größe eines als ausreichend anzusehenden Abstandes zwischen den Ct-Werten der Proben und denen der Negativkontrollen ist aktueller Diskussionsgegenstand. Für diese Arbeit wurde ein hoher und damit sehr sicherer Abstand von mindestens zehn Zyklen als tolerabel festgelegt. Dieses Kriterium konnte bei jeweils einem Versuch mit JEG-3- und JAR-cDNA mit PIAS3 und CASP4 erfüllt werden (siehe Tab. 11). Dies ergab sich zum einen durch die hohen Konzentrationen in den Proben, zum anderen durch eine niedrigere Kontamination der Negativkontrollen als in den Verdünnungsreihen (siehe oben). Letzteres kam vermutlich durch die geringere im Versuch eingesetzte DNA-Gesamtmenge zustande. Für die Versuche mit der cDNA der Zelllinie HTR-8/SVneo konnten aber auch diese Vorgaben nicht eingehalten werden.

Tab. 11 **Tabelle zur Auswertbarkeit der durchgeführten qPCR-Versuche.**

Aufgeführt sind die mittleren Ct-Werte der Negativkontrollen (NTCs) sowie der Proben und ihre Streuung in Form der Standardabweichung der jeweiligen Dreifachbestimmung. Außerdem sind jeweils der kleinste Ct-Wert der Negativkontrollen (NTCs) und der höchste Ct-Wert der Proben angegeben. Deren Differenz findet sich in der Spalte „Differenz der Ct-Werte“. Ist diese größer als 10, wurde die bestehende Kontamination der Negativkontrollen als tolerabel eingestuft.

Versuch	Gen	mittlerer Ct-Wert der NTCs	mittlerer Ct-Wert der Proben	kleinster Ct-Wert der NTCs	höchster Ct-Wert der Proben	Standardabweichung der NTCs	Standardabweichung der Proben (ohne LIF, LIF 30 min, LIF 4 h)	Differenz der Ct-Werte	Kontamination tolerabel
HTR-8/SVneo I	HMBS	28,62	24,29	21,25	25,8	6,54	0,2; 0,27; 0,34	-4,55	nein
	CASP4	33,8	22,04	31,76	23,99	1,88	0,23; 0,18; 0,16	7,77	nein
	PIAS3	36,71	27,63	34,55	30,92	1,95	1,43; 0,15; 0,13	3,63	nein
	SOCS3	24,12	29,59	22,23	32	1,66	0,53; 0,92; 0,64	-9,77	nein
HTR-8/SVneo II	HMBS	31,82	22,5	31,15	24,25	0,95	0,03; 0,13; 0,47	6,9	nein
	CASP4	34,82	21,88	32,55	22,45	2	0,18; 0,14; 0,36	10,1	ja *
	PIAS3	>40	23	>40	25,04		0,28; 0,12; 0,34	>14,96	ja *
	SOCS3	33,36	26,58	31,82	31,33	1,33	1,65; 1,08; 1,29	0,49	nein
JEG-3 I	HMBS	33,32	17,46	32,51	18,25	1,05	0,09; 0,55; 0,25	14,26	ja
	CASP4	37,13	18,22	35,84	19,49	1,29	0,45; 0,17; 0,2	16,35	ja
	PIAS3	36,63/>40	19,53	36,63	21,1		0,16; 0,44; 0,36	15,53	ja
	SOCS3	28,74	28,49	23,1	32,83	4,95	1,74; 0,39; 0,18	-9,73	nein
JEG-3 II	HMBS	36,37	22,37	34,23	23,35	2,16	0,19; 0,3; 0,18	10,88	ja
	CASP4	35,2/>40	23,42	32,87	24,19	3,3	0,34; 0,13; 0,17	8,68	nein
	PIAS3	35,5/>40	25,3	35,5	26,39		0,37; 0,17; 0,07	9,11	nein
	SOCS3	33,02	32,9	31,62	33,71	1,31	0,08; 1,17; 0,82	-2,09	nein
JAR	HMBS	34,18	22,06	33,31	24,1	1,3	0,15; 0,07; 0,5	9,21	nein *
	CASP4	39,62/>40	24,33	39,62	25,75		0,15; 0,5; 0,23	13,87	ja *
	PIAS3	>40	26,72	>40	31,44		2,04; 0,28; 0,34	>8,56	ja*
	SOCS3	32,06	31,6	31,5	33,51	0,53	0,75; 0,89; 1,35	-2,01	nein

* Die Versuche mit den Primern CASP4 und PIAS3 haben sowohl beim 2. Versuch mit cDNA der Zelllinie HTR-8/SVneo (II) als auch beim Versuch mit cDNA der Zelllinie JAR eine tolerable Kontamination, jedoch haben die zugehörigen Versuche mit dem Primer HMBS-3, dem Primer des Referenzgens, eine zu hohe Kontamination, weshalb die Versuche nicht auswertbar waren. Im Versuch mit der Zelllinie JAR lag die Differenz der Ct-Werte von Proben und NTCs für den Primer HMBS-3 jedoch so knapp unter 10, bei geringer Standardabweichung der Proben-Ct-Werte, dass dieser Versuch trotzdem ausgewertet wurde.

Die Daten der Versuche mit tolerabler Kontamination wurden mit dem Programm REST 2009 ausgewertet. Dieses Programm arbeitet mit der Delta-Delta-Ct-Methode, die die Ct-Werte des Referenzgens (in diesem Fall HMBS) und des zu untersuchenden Gens (hier CASP4 und PIAS3) ins Verhältnis setzt, wobei die in den Verdünnungsreihen ermittelten Effizienzen berücksichtigt werden (Pfaffl et al. 2002).

CASP4-Expression nach LIF-Stimulation der Zelllinie JEG-3

Im ersten Versuch mit der cDNA LIF-stimulierter Zellen der Zelllinie JEG-3 wiesen sowohl die Negativkontrollen des Referenzgens HMBS als auch die der zu untersuchenden Gene CASP4 und PIAS3 eine tolerable Kontamination auf (siehe Tab. 11, Abb. 20, Abb. 21, Abb. 22). So wurde mit dem Programm REST 2009 die Veränderung der Expression von CASP4 nach 30 Minuten und 4 Stunden LIF-Stimulation der JEG-3-Zellen berechnet (Abb. 22).

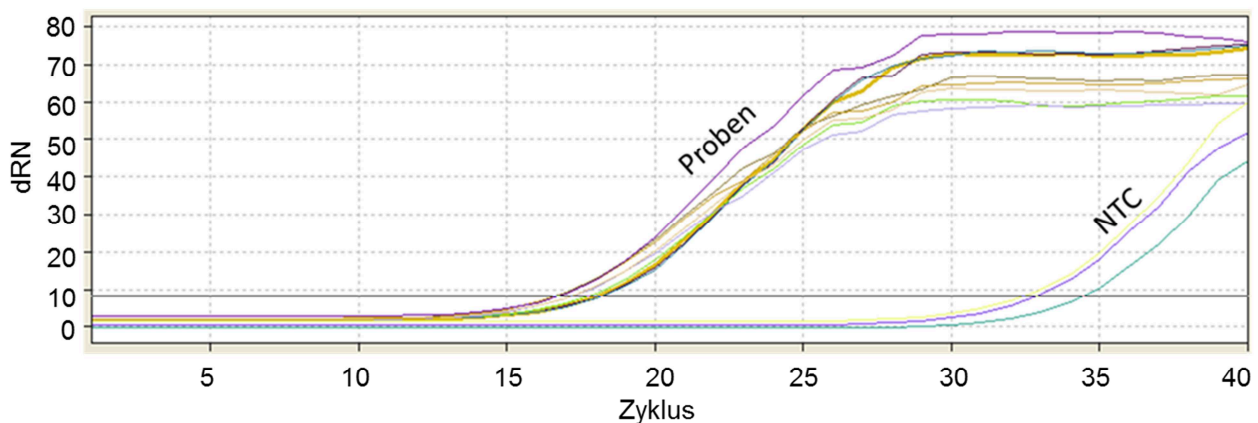


Abb. 20 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JEG-3-Zellen und dem Primerpaar HMBS-3.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Links die Kurven der nicht stimulierten Zellen, der 30 Minuten und der 4 Stunden mit LIF stimulierten Zellen (Proben). Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3. Der kleinste Ct-Wert der Negativkontrollen liegt um 14,26 höher als der höchste Ct-Wert der Proben. Dies spricht für eine tolerable Kontamination.

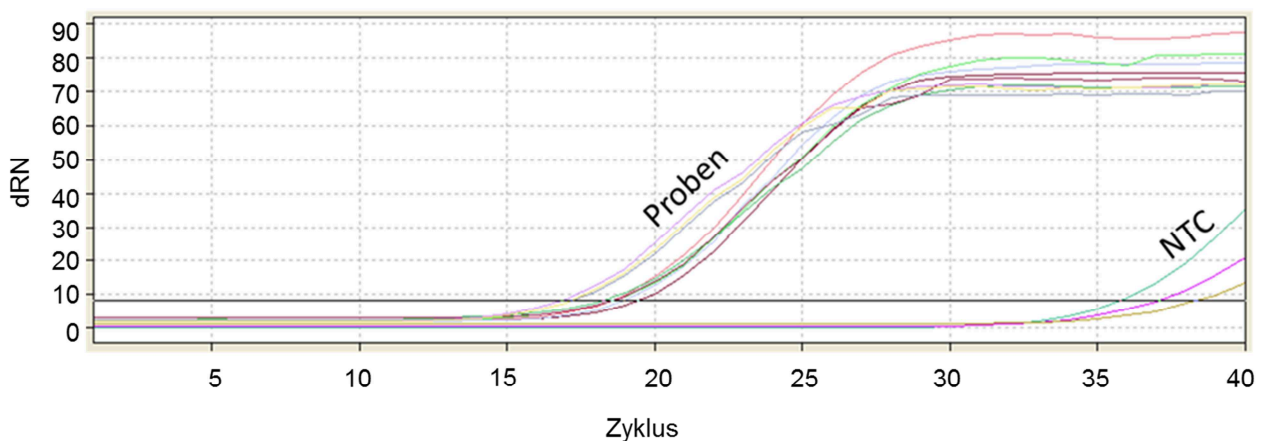


Abb. 21 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JEG-3-Zellen und dem Primerpaar CASP4.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Links die Kurven der nicht stimulierten Zellen, der 30 Minuten und der 4 Stunden mit LIF stimulierten Zellen (Proben). Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3. Der kleinste Ct-Wert der Negativkontrollen liegt um 16,35 höher als der höchste Ct-Wert der Proben. Dies spricht für eine tolerable Kontamination.

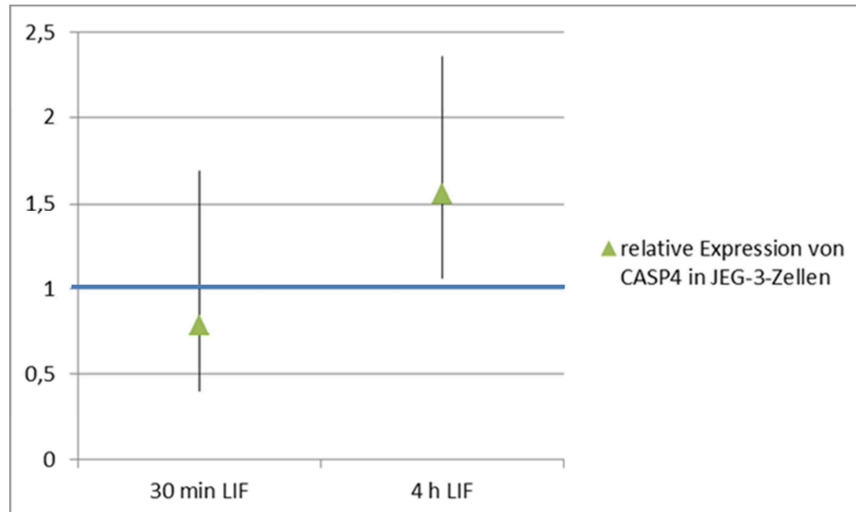


Abb. 22 **Ergebnisse der CASP4-Expressionsanalyse LIF-stimulierter JEG-3-Zellen in der qPCR.** Dargestellt ist die mit dem Programm REST 2009 ermittelte relative Expression nach 30 Minuten und 4 Stunden LIF-Stimulation in Bezug auf nicht stimulierte Zellen, jeweils mit 95%-Konfidenzintervall. Die Expression von CASP4 wurde dabei auf die Expression des Referenzgens HMBS bezogen. Links: Nach 30 Minuten LIF-Stimulation relative Expression 0,783 (95%-Konfidenzintervall 0,402-1,690, $p=0,462$). Rechts: Nach 4 Stunden LIF-Stimulation relative Expression 1,556 (95%-Konfidenzintervall 1,060-2,356, $p<0,001$).

Nach 30 Minuten LIF-Stimulation konnte dabei keine signifikante Expressionsveränderung nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich eine leichte Herabregulation um den Faktor 0,783 mit einem p-Wert von 0,462.

Nach 4 Stunden LIF-Stimulation hingegen stieg die Expression der CASP4 signifikant ($p < 0,001$) um den Faktor 1,556 an.

PIAS3-Expression nach LIF-Stimulation der Zelllinie JEG-3

Auch die Negativkontrollen des Versuchsansatzes mit PIAS3 wiesen eine geringe Kontamination auf, so dass der Versuch ausgewertet werden konnte (Abb. 23). So wurde auch für PIAS3 die Expressionsveränderung nach 30 Minuten und 4 Stunden LIF-Stimulation der JEG-3-Zellen mit dem Programm REST 2009 berechnet (Abb. 24).

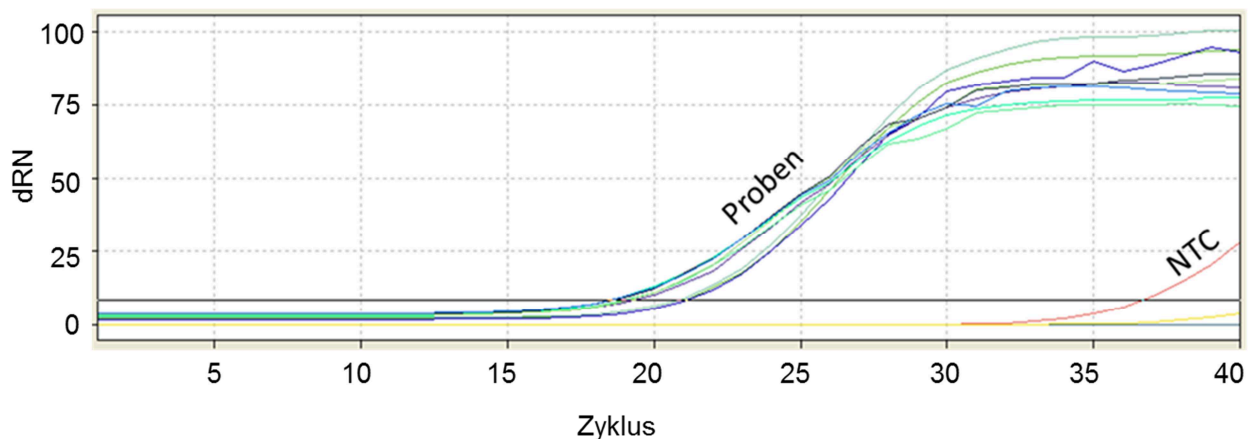


Abb. 23 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JEG-3-Zellen und dem Primerpaar PIAS3.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Links die Kurven der nicht stimulierten Zellen, der 30 Minuten und der 4 Stunden mit LIF stimulierten Zellen (Proben). Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3. Der kleinste Ct-Wert der Negativkontrollen liegt um 15,53 höher als der höchste Ct-Wert der Proben. Dies spricht für eine tolerable Kontamination.

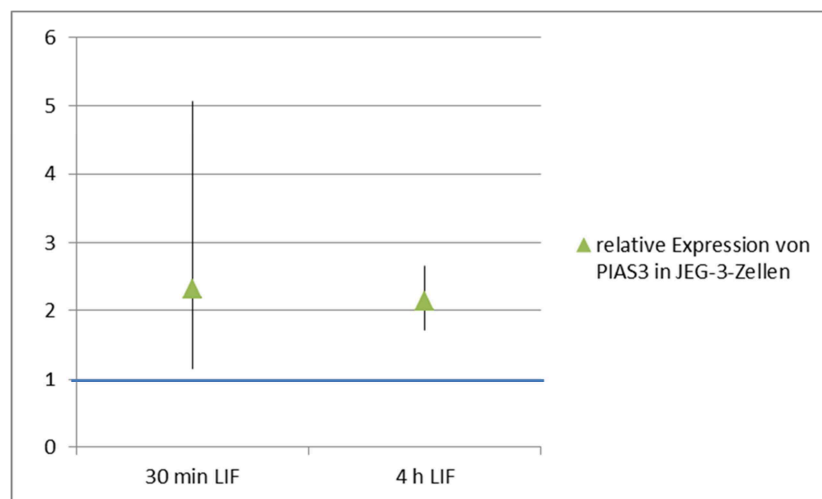


Abb. 24 **Ergebnisse der PIAS3-Expressionsanalyse LIF-stimulierter JEG-3-Zellen in der qPCR.** Dargestellt ist die mit dem Programm REST 2009 ermittelte relative Expression nach 30 Minuten und 4 Stunden LIF-Stimulation in Bezug auf nicht stimulierte Zellen, jeweils mit 95%-Konfidenzintervall. Die Expression von PIAS3 wurde dabei auf die Expression des Referenzgens HMBS bezogen. Links: Nach 30 Minuten LIF-Stimulation relative Expression 2,314 (95%-Konfidenzintervall 1,155-5,073, $p < 0,001$). Rechts: Nach 4 Stunden LIF-Stimulation relative Expression 2,133 (95%-Konfidenzintervall 1,713-2,645, $p < 0,001$).

Es konnte hier nach 30 Minuten LIF-Stimulation eine signifikante ($p < 0,001$) Expressionssteigerung von PIAS3 um den Faktor 2,314 gezeigt werden

Nach 4 Stunden LIF-Stimulation war die Expression von PIAS3 gegenüber dem Kontrollwert ebenfalls signifikant ($p < 0,001$) um den Faktor 2,133 erhöht. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zu den Werten nach 30 Minuten.

CASP4-Expression nach LIF-Stimulation der Zelllinie JAR

Für das Referenzgen HMBS ergibt sich in diesem Versuch für eine der Negativkontrollen (NTCs) ein Ct-Wert, der nur 9,21 Zyklen über dem höchsten Ct-Wert der Proben liegt (Tab. 11). Damit werden die vorgegebenen 10 Zyklen unterschritten und die relative Expression von CASP4 und PIAS3 wäre eigentlich – trotz geringer Kontamination in den NTCs mit diesen Primern - nicht bestimmbar. Folgende Abbildung verdeutlicht aber, dass die Proben innerhalb der Dreifachbestimmung eine geringe Schwankungsbreite aufweisen und die Differenz von den NTCs deutlich ist (Abb. 25).

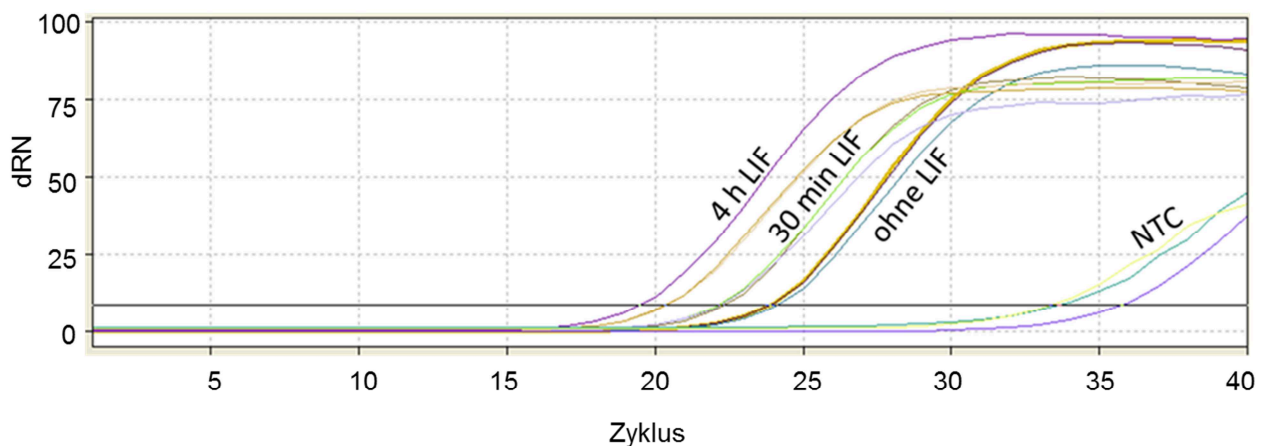


Abb. 25 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JAR-Zellen und dem Primerpaar HMBS-3.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Links die Kurven der nicht stimulierten Zellen (Ohne LIF), der 30 Minuten (30 min LIF) und der 4 Stunden (4 h LIF) mit LIF stimulierten Zellen. Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3. Der kleinste Ct-Wert der Negativkontrollen liegt um 9,21 Zyklen höher als der höchste Ct-Wert der Proben.

Zusätzlich fällt aber eine LIF-stimulationsabhängige Expressionssteigerung des Referenzgens HMBS auf; die Fluoreszenzkurven der stimulierten Proben haben einen deutlichen niedrigeren Ct-Wert als die Kurven der nicht stimulierten Proben. Ein Referenzgen sollte aber ein stimulationsunabhängig gleich bleibend hoch exprimiertes Gen sein. HMBS scheint als solches nicht geeignet zu sein. Folglich sollten die vom Programm REST 2009 mit HMBS normalisierten Ergebnisse auch als nicht-normalisiert betrachtet werden. Dies erfolgt für die JEG-3-Zellen am Ende dieses Kapitels (Tab. 12).

Die NTCs der CASP4-Proben waren nahezu kontaminationsfrei (Abb. 26).

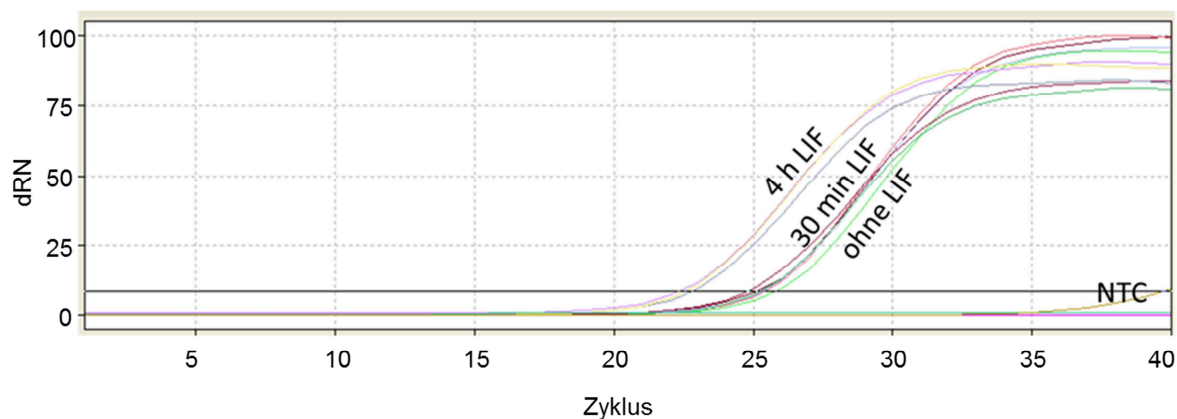


Abb. 26 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JAR-Zellen und dem Primerpaar CASP4.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Links die Kurven der nicht stimulierten Zellen (ohne LIF), der 30 Minuten (30 min LIF) und der 4 Stunden (4 h LIF) mit LIF stimulierten Zellen. Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3. Der kleinste Ct-Wert der Negativkontrollen liegt bei 39,62 und damit um 13,87 höher als die Ct-Werte der Proben. Die Kontamination ist somit tolerabel.

Bei der Auswertung mit dem Programm REST 2009 deutete sich in Bezug auf das Referenzgen HMBS eine verminderte Expression der CASP4 nach LIF-Stimulation von JAR-Zellen an (Abb. 27). Die sowohl nach 30 Minuten als auch nach 4 Stunden LIF-Stimulation als signifikant ($p=0,036$) angegebene Herabregulation der CASP4 ist aufgrund des als Bezug dienenden, aber offensichtlich doch nicht konstant exprimierten Referenzgens HMBS jedoch nicht als echt anzusehen. Vielmehr lässt sich bereits in Abb. 26 eine Expressionssteigerung nach 4 Stunden LIF-Stimulation erkennen. Diese wird vom Programm REST 2009 als nicht-normalisiertes Ergebnis auch mit $p<0,001$ angegeben (siehe auch Tab. 12).

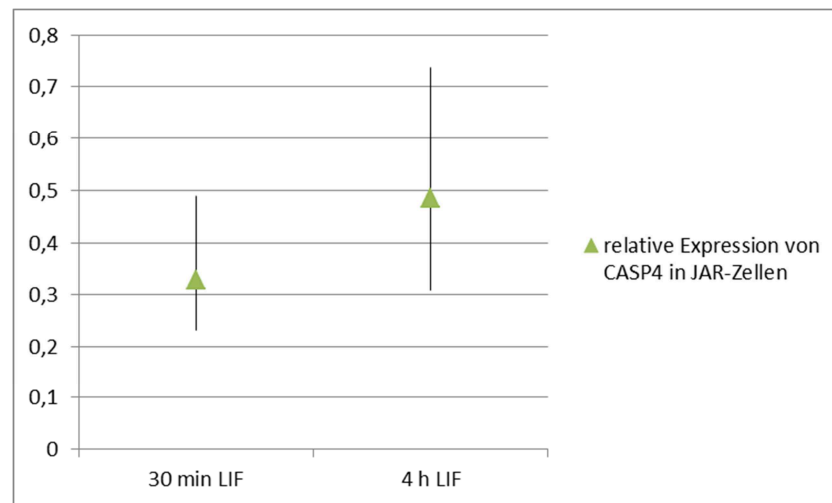


Abb. 27 **Ergebnisse der CASP4-Expressionsanalyse LIF-stimulierter JAR-Zellen in der qPCR.** Dargestellt ist die mit dem Programm REST 2009 ermittelte relative Expression nach 30 Minuten und 4 Stunden LIF-Stimulation in Bezug auf nicht stimulierte Zellen, jeweils mit 95%-Konfidenzintervall. Die Expression von CASP4 wurde dabei auf die Expression des Referenzgens HMBS bezogen. Links: Nach 30 Minuten LIF-Stimulation relative Expression 0,328 (95%-Konfidenzintervall 0,231-0,489, $p=0,036$). Rechts: Nach 4 Stunden LIF-Stimulation relative Expression 0,486 (95%-Konfidenzintervall 0,309-0,738, $p=0,036$).

PIAS3-Expression nach LIF-Stimulation der Zelllinie JAR

Die NTCs des PIAS3-Versuchsansatzes mit der cDNA der Zelllinie JAR wiesen keine messbare Kontamination auf (Abb. 28).

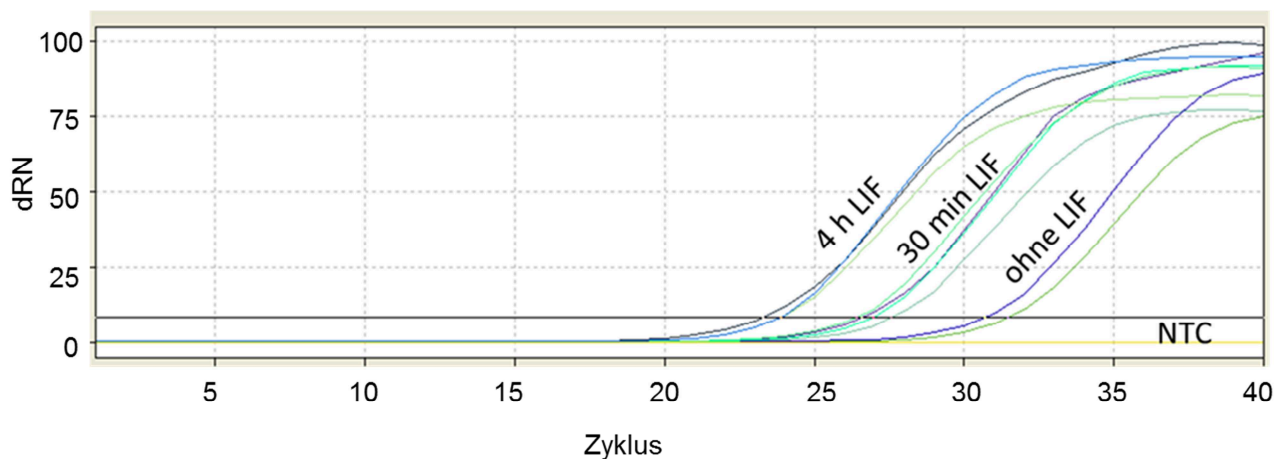


Abb. 28 **PCR mit der cDNA LIF-stimulierter JAR-Zellen und dem Primerpaar PIAS3.**

Aufgetragen ist die Fluoreszenz in den Proben in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. Durch die Dreifachbestimmung sieht man jeweils 3 gruppierte Kurven. Rechts die Kurven der Negativkontrollen (NTC). Links die Kurven der nicht stimulierten Zellen (ohne LIF), der 30 Minuten (30 min LIF) und der 4 Stunden (4 h LIF) mit LIF stimulierten Zellen. Der Treshold (verdeutlicht durch die horizontale Linie) liegt bei 8,3. Für keine der Negativkontrollen ließ sich ein Ct-Wert ermitteln.

Die Auswertung mit dem Programm REST 2009 konnte hier keinen signifikanten Expressionsunterschied für PIAS3 nach LIF-Stimulation – bezogen auf das Referenzgen HMBS – zeigen (Abb. 29). Nicht-normalisiert – also ohne Bezug zum nicht geeigneten Referenzgen HMBS - zeigte sich sowohl nach 30 Minuten ($p=0,036$) als auch nach 4 Stunden LIF-Stimulation ($p=0,037$) jedoch eine Heraufregulation von PIAS3.

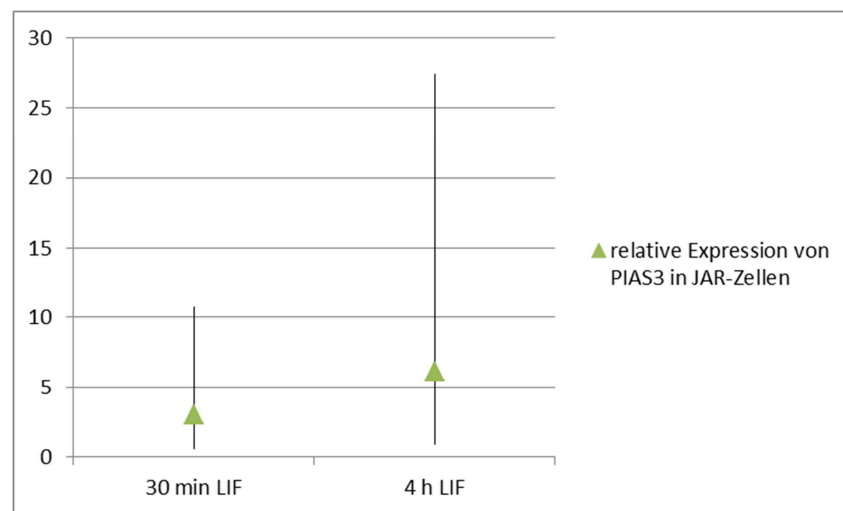


Abb. 29 **Ergebnisse der PIAS3-Expressionsanalyse LIF-stimulierter JAR-Zellen in der qPCR.** Dargestellt ist die mit dem Programm REST 2009 ermittelte relative Expression nach 30 Minuten und 4 Stunden LIF-Stimulation in Bezug auf nicht stimulierte Zellen, jeweils mit 95%-Konfidenzintervall. Die Expression von PIAS3 wurde dabei auf die Expression des Referenzgens HMBS bezogen. Links: Nach 30 Minuten Stimulation Expressionssteigerung um den Faktor 3,018 (95%-Konfidenzintervall 0,553-10,735, $p=0,327$). Rechts: Nach 4 Stunden Stimulation Expressionssteigerung um den Faktor 6,117 (95%-Konfidenzintervall 0,930-27,373, $p=0,148$).

Folgende Tabelle (Tab. 12) zeigt zusammenfassend die mit dem Programm REST 2009 berechneten nicht-normalisierten Expressionsveränderungen nach LIF-Stimulation in den ausgewerteten Versuchen. Da HMBS durch seine eigene stimulationsabhängige Expressionssteigerung als Referenzgen nicht geeignet ist, sind ausschließlich die nicht-normalisierten Ergebnisse auswertbar.

Tab. 12 **Zusammenfassung der mit dem Programm REST 2009 ermittelten nicht-normalisierten Expressionsveränderungen** in den ausgewerteten qPCR-Versuchen.

Zelllinie	Gen	LIF-Stimulationszeit	Faktor der Expressionsänderung	95%-Konfidenzintervall	p-Wert	Signifikanz
JEG-3	CASP4	30 min	1,416	0,980-2,080	0,164	nein
		4 h	3,488	2,358-5,218	0,036	ja
	PIAS3	30 min	4,184	2,969-6,315	<0,001	ja
		4 h	4,779	3,314-6,229	0,047	ja
JAR	CASP4	30 min	1,004	0,664-1,483	0,898	nein
		4 h	5,834	4,656-7,265	<0,001	ja
	PIAS3	30 min	9,232	1,618-31,252	0,036	ja
		4 h	73,418	13,024-262,334	0,037	ja

Zusammenfassend ist zu sagen, dass CASP4 und PIAS3 sowohl in JEG-3- als auch in JAR-Zellen nach LIF-Stimulation scheinbar vermehrt exprimiert werden, wobei der Effekt nach 4 Stunden Stimulation stärker zu sein scheint als nach 30 Minuten Stimulation.

Durch die beschriebene Kontaminationsproblematik, die inkonstante Expression des Referenzgens HMBS und die geringe Anzahl der ausgewerteten Versuche bedürfen diese Ergebnisse weiterer Überprüfung.

6 Diskussion

Der JAK-STAT-Signalweg ist ein wichtiger Signaltransduktionsweg für eine Vielzahl von Zytokinen in unterschiedlichsten Zellpopulationen. Unter anderem steuert er zu einem großen Teil das Wachstum, Invasions- und Migrationsverhalten von Trophoblastzellen. Diese ähneln in ihrem invasiven Verhalten bösartigen Tumorzellen, so dass man sich aus genaueren Kenntnissen über die Regulation des JAK-STAT-Signalweges in Trophoblastzellen auch Erkenntnisse über die Regulation und mögliche medikamentöse Beeinflussung von Tumorzellen erhofft.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der drei Zytokine LIF, Oncostatin M und GM-CSF auf die Expression verschiedener Zielgene des JAK-STAT-Signalweges in den drei Trophoblastzelllinien JEG-3, HTR-8/SVneo und JAR mithilfe verschiedener PCR-Verfahren vergleichend zu untersuchen.

Die für Vorversuche genutzte konventionelle PCR zeigte sich hier als zu wenig sensitives Verfahren für die Expressionsanalyse der zu untersuchenden Gene STAT3, CASP4, TIMP1, PIAS3, SOCS3, MMP2 und MMP9. Die nach Primerdesign und Optimierung der PCR-Bedingungen durchgeführten Versuche mit cDNA stimulierter Zellen zeigten keine Expressionsunterschiede zwischen nicht stimulierten und stimulierten Zellen. Vermutlich nur niedrig exprimierte Gene wie beispielsweise SOCS3 waren in der Agarosegelelektrophorese nach Multiplex-PCR nicht nachweisbar.

In der daraufhin durchgeführten hochsensitiven *Low-volume-RT-PCR* mit anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass SOCS3 in HTR-8-Zellen durch LIF-Stimulation vermehrt exprimiert wird. Dabei waren die entsprechenden Banden nach 30 Minuten Stimulation deutlich kräftiger als nach 4 Stunden Stimulation zu erkennen, was auf ein Nachlassen des Effektes nach mehreren Stunden hindeutet.

Über die Induktion von SOCS3 durch LIF wurde bereits in Versuchen mit 3T3-F442A-Zellen (murine Pre-Adipozyten) berichtet (Adams et al. 1998). SOCS3 bildet dann einen negativen Rückkopplungsmechanismus des JAK-STAT-Signalweges (Nicholson et al. 1999, Ram und Waxman 2000, Zhang et al. 1999). Zudem wurde gezeigt, dass die LIF-induzierte Makrophagendifferenzierung muriner M1-Zellen durch SOCS3 verhindert werden kann (Nicholson et al. 1999). *In vivo*, im Knockout-Mausmodell, konnte dann nachgewiesen werden, dass ein Mangel an LIF-Rezeptoren die

Trophoblastendifferenzierung verhindert, wohingegen ein Mangel an SOCS3 sie verstärkt (Takahashi et al. 2003). SOCS3 ist also negativer Rückkopplungsmechanismus für die LIF-induzierte Trophoblastendifferenzierung.

Dieser Mechanismus konnte in der vorliegenden Arbeit lediglich für HTR-8/SVneo-Zellen gezeigt werden, nicht jedoch für JEG-3- oder JAR-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass JEG-3- und JAR-Zellen als Tumorzelllinien diese Eigenschaft der negativen Rückkopplung über SOCS3 durch Mutationen verloren haben, wohingegen sie die nicht tumorösen HTR-8/SVneo-Zellen, die mit Hilfe von Virentransfektion immortalisiert wurden, behielten. Die mangelnde negative Rückkopplung des JAK-STAT-Signalweges könnte so auch mit zur Malignität der Zellen beitragen. Diese Vermutung wird durch eine Veröffentlichung untermauert, in der gezeigt werden konnte, dass SOCS3-Knockout-Mäuse, denen spezifisch gastrointestinal SOCS3 fehlt, Magentumoren mit STAT3-Überaktivität entwickeln (Inagaki-Ohara et al. 2012). SOCS3 agiert hier somit als Tumorsuppressorgen.

Oncostatin M und GM-CSF waren in den durchgeführten Versuchen bei keiner der Zelllinien in der Lage, einen Anstieg der SOCS3-Expression zu bewirken. Die in der Einleitung beschriebenen Ähnlichkeiten der beiden IL-6-Zytokine LIF und Oncostatin M ließen vermuten, mit Oncostatin M ebenfalls eine erhöhte Expression von SOCS3 beobachten zu können. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Oncostatin M ein starker Induktor von SOCS-3 in Astrozyten ist (Baker et al. 2008). Die Gründe, warum SOCS3 in HTR-8/SVneo-Zellen deutlich durch LIF, aber nicht durch Oncostatin M induziert werden kann, können vielfältig sein. Zum einen könnte der LIF-Rezeptor, an den normalerweise auch Oncostatin M binden kann (Gearing und Bruce 1992), bei HTR-8/SVneo-Zellen so verändert sein, dass er nur noch geringe Affinität zu Oncostatin M besitzt. Zum anderen könnte die Ursache in den vielfältigen Verknüpfungen der unterschiedlichen Signalwege innerhalb und außerhalb der Zelle zu suchen sein, wie zum Beispiel in hier nicht erfassten Inhibitoren. Nicht außer Acht zu lassen sind zudem methodische Ursachen wie zum Beispiel eine verminderte Wirkweise des eingesetzten Oncostatin M. Dies könnte durch die Mitführung einer Positivkontrolle bei weiteren Experimenten überprüft werden.

Für die ebenfalls untersuchten Gene STAT3, CASP4, TIMP1, PIAS3, MMP2 und MMP9 konnte keine Expressionsänderung nach Stimulation mit LIF, GM-CSF oder Oncostatin M gezeigt werden. Die Ursache hierfür ist mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in der Methode

– die *Low-volume-RT-PCR* ist eine Endpunkt-PCR – zu suchen. Die genannten Gene wiesen im Vergleich zu SOCS3 bereits eine hohe Ausgangsexpression in nicht stimulierten Zellen auf, so dass mit dieser Methode keine weitere Expressionssteigerung gezeigt werden konnte.

Ein großes Problem der *Low-volume-RT-PCR* war eine hohe Kontaminationsrate der Negativkontrollen. Diese ist, wie im Kapitel 5.2.2 bereits beschrieben, unter anderem auf die hohe Sensitivität des Systems, das schon einzelne Kopien eines Genes nachweisen kann, zurückzuführen. Zudem gab es eine Vielzahl an Kontaminationsmöglichkeiten: Die Reaktionsringe auf dem AmpliSlide-Objektträger sind nicht abgeschlossen; Aerosole können leicht andere Reaktionsringe kontaminieren. Durch die fehlende räumliche Trennung von Prä- und Post-PCR-Bereich könnte auch schon die Produktkonzentration in der Raumluft die Reaktionsringe verunreinigen. Das Pipettieren der PCR an anderen Plätzen im Labor wurde erprobt, hatte aber vermutlich aufgrund der erstgenannten Kontaminationsmöglichkeiten keine großen Verbesserungen zur Folge. Kontaminationen, die in diesem System zur Geltung kommen, würden großenteils in anderen, weniger sensitiven PCR-Verfahren keine Auswirkungen zeigen.

Die *Low-volume-RT-PCR* sollte vor allem auch der Vorbereitung der *Single-cell-PCR* dienen. Um die möglicherweise voneinander abweichenden Genexpressionsmuster einzelner Zellen innerhalb einer Population zu untersuchen, wurden dafür einzelne Zellen mit dem Mikromanipulator auf die *Slides* des *AmpliSpeed slide cyclor ASC400D* aufgebracht und dann analog der *Low-volume-RT-PCR* untersucht. Hier zeigten sich von Versuch zu Versuch unterschiedlichste Bandenmuster. Dies könnte zunächst noch durch die den Vermutungen entsprechend voneinander abweichenden Genexpressionsmuster der einzelnen Zellen erklärt werden. Gemeinsam mit den wie in der *Low-volume-RT-PCR* kontaminierten Negativkontrollen, die häufig ähnliche Bandenmuster wie die eigentlichen Proben aufwiesen, ist dies jedoch eher als Ausdruck der methodischen Unzulänglichkeiten der *Single-cell-PCR* als Variante der *Low-volume-RT-PCR* zu sehen. Die inkonsistenten Ergebnisse traten auch bei Versuchen an anderen Zelltypen und Genen von Jana Pastuschek (Pastuschek 2012) und Sebastian Grosse (Grosse 2014) aus dem Plazentalabor auf. Sie zeigten, dass das für die Arbeit mit dem Mikromanipulator verwendete Lösungsmittel PBS vermutlich durch beschädigte Zellen selbst schon solche Mengen RNA enthielt, dass es allein aufgetragen zu Banden führte, die von Proben mit enthaltener Zelle nicht zu unterscheiden waren. Aus diesen Gründen wurde die *Single-*

cell-PCR nicht weitergeführt.

Die *Low-volume-RT-PCR* und die Variante *Single-cell-PCR* sind genau wie die konventionelle PCR Endpunkt-PCRs, die keinen quantitativen Vergleich der Expressionsstärke, sondern lediglich eine dichotome Aussage darüber zulassen, ob ein Gen in größerem Maße exprimiert wird oder nicht nachweisbar ist. Aufgrund dessen wurde im Anschluss eine quantitative *Real-Time-PCR* (qPCR) durchgeführt. Eine absolute Quantifizierung der Genexpression wurde dabei aufgrund der nicht erfassten RNA-Qualität nicht angestrebt. Mit dem Computerprogramm REST2009 (Pfaffl et al. 2002) ist es allerdings durch Normalisierung der Probenwerte auf ein Referenzgen und unter Einbezug der in einer Standardreihe ermittelten Effizienzen möglich, eine relative Quantifizierung durchzuführen.

Die Verifizierung des in der *Low-volume-RT-PCR* gezeigten Anstieges der SOCS3-Expression in HTR-8/SVneo-Zellen nach LIF-Stimulation war jedoch mittels der qPCR nicht möglich, da die bereits in der *Low-volume-RT-PCR* aufgefallene Kontaminationsproblematik in der qPCR die Auswertung aller mit SOCS3 sowie HTR-8/SVneo-Zellen durchgeführten Versuche unmöglich machte. Die verschiedenen Versuche zur Verminderung der Kontaminationen, wie zum Beispiel das Pipettieren der PCR-Ansätze in anderen Räumen oder die UV-Bestrahlung der verwendeten Pipetten, blieben auch hier erfolglos. So blieb auch die Frage offen, ob die Expression von SOCS3 in JAR- und JEG-3-Zellen nach LIF-Stimulation, welche mittels der *Low-volume-RT-PCR* nicht detektiert werden konnte, doch einer geringen Regulation unterliegt. Die Signale der Proben mit SOCS3 in den kontaminationsbedingt unausgewerteten qPCR-Versuchen lassen in allen drei Zelllinien erkennen, dass SOCS3 – im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen – generell sehr niedrig exprimiert wird. So ist es besonders wichtig, an der Verhinderung der Kontamination der SOCS3-Proben zu arbeiten, um mögliche geringe Änderungen der Expression bei einer niedrigen basalen Expression detektieren zu können.

Ebenfalls mit zu hohen RNA-Kontaminationen für eine Auswertung der Versuche behaftet waren die Standardreihen der Gene TIMP1 und MMP9. Eine Fortführung der Versuche bleibt aber anzustreben, denn MMP9 spielt durch die Freisetzung der aktiven Form von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und die Degradation der Proteine der vaskulären Basalmembran eine große Rolle in der Angiogenese (Bergers und Coussens

2000). Zudem aktiviert MMP9 Signalproteine wie IL-8, IL-1 β und TGF- β (Chakrabarti und Patel 2005). Es ist kein ubiquitär exprimiertes Enzym, sondern wird vor allem durch inflammatorische Stimuli induziert (Opdenakker et al. 1991). So wird MMP9 auch im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder chronischem Asthma bronchiale sowie vielen Tumorerkrankungen (Bjorklund und Koivunen 2005) erforscht. MMP9 wird durch TIMP1 gehemmt (Crocker et al. 2004). Für primäre Ersttrimester-EVT-Zellkulturen wurde beschrieben, dass LIF die MMP2- und MMP9-Sekretion nicht veränderte, aber die Sekretion von TIMP1 und TIMP2 steigerte (Tapia et al. 2008). Hingegen konnte eine Herabregulation von TIMP-1 durch LIF in JEG-3-Zellen gezeigt werden (Fitzgerald et al. 2005b).

Bei der Analyse der gering bis nicht kontaminierten Versuche mit CASP4 und PIAS3 in JEG-3- und JAR-Zellen fiel eine deutliche stimulationsabhängige Expressionsänderung des als Referenzgen genutzten HMBS auf. Das Referenzgen sollte ein stimulationsunabhängig gleichbleibend stark exprimiertes Gen sein, um zur Normalisierung der anderen untersuchten Gene zu dienen. HMBS erfüllte diese Anforderung nicht, so dass die Normalisierung der Ergebnisse mit dem Programm REST2009 nicht zu reliablen Ergebnissen führte. Zu HMBS als Referenzgen bei der Analyse verschiedenster Zellen liegen zahlreiche Publikationen vor (Kowalewska et al. 2012, Luchsinger et al. 2013), jedoch nicht für die Analyse von Trophoblastzellen. Es sollte also nach einem geeigneteren Referenzgen für Trophoblastzellen gesucht werden.

Bei Betrachtung der nicht-normalisierten Ergebnisse zeigte sich, dass CASP4 und PIAS3 sowohl in JEG-3- als auch in JAR-Zellen nach LIF-Stimulation vermehrt exprimiert zu werden schienen, wobei der Effekt nach 4 Stunden Stimulation noch stärker zu beobachten war als nach 30 Minuten Stimulation.

In der Arbeit von (Fitzgerald et al. 2005b) wurde bereits für JEG-3-Zellen gezeigt, dass die CASP4-Expression nach LIF-Stimulation ansteigt. JAR-Zellen verhalten sich hier also vermutlich ähnlich, was mit der gemeinsamen Abstammung aus Trophoblastzellen zu erklären ist, die mithilfe der CASP4 das Zytokin IL-1 β in seine aktive Form umwandeln und so die Implantation des Embryos ermöglichen (Kamens et al. 1995).

Für PIAS3 liegen derzeit keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Sie erscheinen jedoch plausibel, wenn man bedenkt, dass PIAS3 über die Bindung an STAT3 ein Inhibitor des JAK-STAT-Signalweges ist (Chung et al. 1997) und die negative Rückkopplung ein

häufiger Mechanismus zur Limitierung eines angestoßenen Signalübertragungsprozesses ist. Das Fehlen von PIAS-Homologen bei *Drosophila* führt durch die mangelnde Limitierung des JAK-STAT-Signalweges zu einer höheren Entstehungswahrscheinlichkeit für Leukämien (Betz et al. 2001). Bei JEG-3- und JAR-Zellen als Tumorzelllinien scheint PIAS3 nach den vorliegenden Ergebnissen aber nicht in deren Genese involviert zu sein.

Aufgrund des Fehlens eines verlässlichen Referenzgens und der kontaminationsbedingt geringen Anzahl der ausgewerteten Versuche bedürfen die Ergebnisse der qPCR-Versuche jedoch zwingend weiterer Überprüfung.

Die Etablierung der qPCR ermöglicht, die Versuche auch nach Oncostatin M- und GM-CSF-Stimulation sowie mit weiteren Genen durchzuführen. Für die Gene STAT3 und MMP2 beispielsweise lagen keine für die qPCR geeigneten Primer vor. Hier wären weitere Versuche interessant, da MMP2 wie MMP9 neben der Spaltung von Kollagenen, Elastin und Vitronektin (Chakrabarti und Patel 2005) auch an der Neovaskularisation beteiligt ist (Shapiro et al. 2010) und über die Prozessierung von Signalproteinen außerdem bei Inflamationsprozessen eine Rolle spielt (Schonbeck et al. 1998). Von STAT3 als direktem Bestandteil des untersuchten Signalweges ist bekannt, dass es durch Phosphorylierung ohne Ligandenbindung und somit daueraktiviert an Tumorstadium beteiligt ist (Bromberg et al. 1999, Migone et al. 1995).

Die qPCR ist unter den verschiedenen durchgeführten PCR-Verfahren als das vielversprechendste Verfahren zur Genexpressionsanalyse anzusehen, da es am sensitivsten die Expressionsveränderungen nach Stimulation der Zelllinien darstellt.

So könnten auch die Verknüpfungen jenseits des bekannten JAK-STAT-Signalweges untersucht werden. Eine neuere Veröffentlichung zeigt beispielsweise, dass auch die ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*)-Aktivierung wichtig für den LIF-induzierten Proliferationsanstieg bei HTR-8/SVneo-Zellen ist (Prakash et al. 2011).

Ein weiterer neuer Zweig ist die Untersuchung von Micro-RNAs, kurzen, nicht-kodierenden RNA-Sequenzen, die die Genexpression posttranskriptional beeinflussen. In einer Publikation aus diesem Labor wurde gezeigt, dass LIF die Expression von Micro-RNA in JEG-3-Zellen beeinflusst (Morales-Prieto et al. 2011). Dies könnte das Bindeglied für viele Effekte der LIF-Stimulation sein, die sich nicht mit herkömmlichen Signaltransduktionswegen erklären lassen.

Es bleibt folglich noch großer Forschungsbedarf hinsichtlich der Signaltransduktion in Trophoblastzellen, um in Zukunft Therapiemöglichkeiten für Krebserkrankungen sowie immunologische Krankheiten ableiten zu können.

7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der drei Zytokine LIF, Oncostatin M und GM-CSF auf die Expression verschiedener Zielgene des JAK-STAT-Signalweges in den drei Trophoblastzelllinien JEG-3, HTR-8/SVneo und JAR mithilfe verschiedener PCR-Verfahren vergleichend untersucht. Trophoblastzellen wachsen als embryonale Zellen invasiv in mütterliches, fremdes Gewebe ein und ähneln damit Tumorzellen. Im Gegensatz zu deren unkontrollierter Ausbreitung werden Trophoblastzellen jedoch durch zahlreiche Signale gesteuert. Dabei spielt der JAK-STAT-Signalweg eine zentrale Rolle, so dass man sich von der Erforschung seiner Steuerung Erkenntnisse für die Behandlung von Tumoren, aber auch von Erkrankungen des Immunsystems verspricht.

Die zu Beginn durchgeführte konventionelle PCR zeigte eine zu geringe Sensitivität für Expressionsanalysen und wurde daher nur für Etablierungszwecke genutzt.

In der hochsensitiven *Low-volume-PCR* konnte eine Steigerung der Expression von SOCS3 nach LIF-Stimulation von HTR-8/SVneo-Zellen gezeigt werden, jedoch nicht nach entsprechender Stimulation der anderen beiden Zelllinien. SOCS3 ist ein Inhibitor des JAK-STAT-Signalweges, bildet also bei HTR-8/SVneo-Zellen einen negativen Rückkopplungsmechanismus. JEG-3 und JAR sind im Gegensatz zu HTR-8/SVneo Tumorzelllinien. Sie könnten die negative Rückkopplung durch Mutationen verloren haben. SOCS3 könnte also als inaktiviertes Tumorsuppressorgen zur Tumorentstehung beigetragen haben.

In der *Single-cell-PCR* sollte das Expressionsverhalten einzelner Zellen untersucht werden, was jedoch wegen grundlegender, nicht auszuräumender methodischer Mängel nicht gelang.

In der quantitativen *Real-time-PCR* (qPCR) konnte gezeigt werden, dass CASP4 und PIAS3 sowohl in JEG-3- als auch in JAR-Zellen nach LIF-Stimulation scheinbar vermehrt exprimiert werden. CASP4 ist über das Zytokin IL-1 β an der Implantation des Embryos beteiligt; die Implantation wird also wahrscheinlich auf diesem Weg mitgesteuert. PIAS3 ist über die Bindung an STAT3 ein Inhibitor des JAK-STAT-Signalweges, so dass hier ebenfalls ein negativer Rückkopplungsmechanismus vorzuliegen scheint, in dem PIAS3 als Tumorsuppressorgen agieren kann.

Die qPCR erschien unter den verschiedenen PCR-Verfahren als das vielversprechendste,

da mit ihr auch sehr kleine Expressionsunterschiede nachgewiesen werden können, die in den anderen Verfahren als Endpunkt-PCRs nicht detektierbar sind. Mit ihr können nun die in dieser Arbeit begonnen Versuche fortgeführt und auf andere Zelllinien, andere Zytokine und andere Zielgene ausgeweitet werden. Optimierungsbedarf besteht dabei für nachfolgende Versuche in der Vermeidung von DNA-Kontamination, die in den bereits durchgeführten Versuchen zum Teil schon vermindert werden konnte, aber gerade bei den sehr sensitiven Nachweisverfahren weiter von großer Bedeutung ist. Zudem sollte für die qPCR nach einem geeigneteren Referenzgen gesucht werden, da sich für HMBS nach Stimulation Expressionsänderungen zeigten.

Bis zum vollständigen Verständnis der Regulationsvorgänge in Trophoblastzellen werden allerdings noch zahlreiche Versuche nötig sein. Der JAK-STAT-Signalweg selbst ist komplex – die in dieser Arbeit untersuchten Gene bilden nur einen kleinen Ausschnitt ab – und zudem ist er vielfältig mit anderen Signalwegen verknüpft. Darüber hinaus gibt es zu den bekannten Signalwegen neuentdeckte Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel MicroRNAs. Es bleibt folglich noch großer Forschungsbedarf hinsichtlich der komplexen Abläufe in der Trophoblastzelle, um in Zukunft Therapiemöglichkeiten für Krebserkrankungen oder immunologische Krankheiten ableiten zu können.

8 Literaturverzeichnis

- Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N. 1998. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J Biol Chem*, 273 (3):1285-1287.
- An ZW, Xie LL, Cheng H, Zhou Y, Zhang Q, He XG, Huang HS. 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. *Anal Biochem*, 391 (1):77-79.
- Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy TL, Murphy KM, Modlin RL, Shuai K. 2003. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem*, 278 (24):21327-21330.
- Baker BJ, Qin H, Benveniste EN. 2008. Molecular basis of oncostatin M-induced SOCS-3 expression in astrocytes. *Glia*, 56 (11):1250-1262.
- Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Loning T, Bamberger MC. 2000. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (10):3932-3936.
- Barasch J, Yang J, Ware CB, Taga T, Yoshida K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Parravicini E, Malach S, Aranoff T, Oliver JA. 1999. Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell*, 99 (4):377-386.
- Bauer S, Rasika S, Han J, Mauduit C, Raccurt M, Morel G, Jourdan F, Benahmed M, Moyse E, Patterson PH. 2003. Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J Neurosci*, 23 (5):1792-1803.
- Begley CG. 1994. The SCL transcription factor and differential regulation of macrophage differentiation by LIF, OSM and IL-6. *Stem Cells*, 12 Suppl 1:143-149; discussion 149-151.
- Bergers G, Coussens LM. 2000. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev*, 10 (1):120-127.
- Betz A, Lampen N, Martinek S, Young MW, Darnell JE, Jr. 2001. A Drosophila PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (17):9563-9568.
- Bjorklund M, Koivunen E. 2005. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1755 (1):37-69.
- Bromberg JF, Fan Z, Brown C, Mendelsohn J, Darnell JE, Jr. 1998. Epidermal growth factor-induced growth inhibition requires Stat1 activation. *Cell Growth Differ*, 9 (7):505-512.
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. 1999. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 98 (3):295-303.
- Brown MA, Metcalf D, Gough NM. 1994. Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse and are induced by inflammation. *Cytokine*, 6 (3):300-309.
- Bruce AG, Hoggatt IH, Rose TM. 1992. Oncostatin M is a differentiation factor for myeloid leukemia cells. *J Immunol*, 149 (4):1271-1275.
- Bustin SA, Nolan T. 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 15 (3):155-166.
- Chakrabarti S, Patel KD. 2005. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp Lung Res*, 31 (6):599-621.
- Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.

- Cline MJ, Golde DW. 1974. Production of colony-stimulating activity by human lymphocytes. *Nature*, 248 (450):703-704.
- Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. 2004. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res*, 75 (1):1-11.
- Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY. 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha v \beta 3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 263 (2):209-223.
- DiPersio J, Billing P, Kaufman S, Eghtesady P, Williams RE, Gasson JC. 1988. Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem*, 263 (4):1834-1841.
- Dorak MT, Hrsg. 2006. Real-time PCR. Aufl. New York: Taylor & Francis.
- Dubois B, Arnold B, Opdenakker G. 2000. Gelatinase B deficiency impairs reproduction. *J Clin Invest*, 106 (5):627-628.
- Eichelkraut K. 2011. Funktionelle Analyse der Zelllinien HTR-8 (Trophoblast) und Jeg-3 (Chorionkarzinom) nach Stimulation mit G-CSF und GM-CSF [Bachelor of Engineering]. Jena: Fachhochschule.
- Ellis HM, Horvitz HR. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44 (6):817-829.
- Esparza J, Kruse M, Lee J, Michaud M, Madri JA. 2004. MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity. *FASEB J*, 18 (14):1682-1691.
- Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. 2005a. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy*, 88:181-199.
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. 2005b. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (11):2284-2296.
- Garcia-Lloret MI, Morrish DW, Wegmann TG, Honore L, Turner AR, Guilbert LJ. 1994. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp Cell Res*, 214 (1):46-54.
- Gasson JC. 1991. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 77 (6):1131-1145.
- Gasson JC, Weisbart RH, Kaufman SE, Clark SC, Hewick RM, Wong GG, Golde DW. 1984. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science*, 226 (4680):1339-1342.
- Gearing DP, Bruce AG. 1992. Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor. *New Biol*, 4 (1):61-65.
- Gearing DP, King JA, Gough NM, Nicola NA. 1989. Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *EMBO J*, 8 (12):3667-3676.
- Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. 1987. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*, 6 (13):3995-4002.
- Gough NM, Gearing DP, King JA, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. 1988. Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene

- encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (8):2623-2627.
- Gross J, Lapiere CM. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48:1014-1022.
- Grosse S. 2014. Analyse der Onkostatin M-abhängigen Genexpression in der Trophoblast-Zelllinie HTR8/SVneo und Etablierung einer Einzelzell-PCR [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, et al. 1995. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J*, 14 (7):1421-1429.
- Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63 (6):1149-1157.
- Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. 1988. Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells. *Anal Biochem*, 173 (2):359-367.
- Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML. 1998. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (5):1721-1729.
- Hui W, Bell M, Carroll G. 1997. Detection of oncostatin M in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 56 (3):184-187.
- Imakawa K, Carlson KD, McGuire WJ, Christenson RK, Taylor A. 1997. Enhancement of ovine trophoblast interferon by granulocyte macrophage-colony stimulating factor: possible involvement of protein kinase C. *J Mol Endocrinol*, 19 (2):121-130.
- Inagaki-Ohara K, Mayuzumi H, Kato S, Minokoshi Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Matsuzaki G, Yoshimura A. 2012. Enhancement of leptin receptor signaling by SOCS3 deficiency induces development of gastric tumors in mice. *Oncogene*.
- Ivashkiv LB. 2000. Jak-STAT signaling pathways in cells of the immune system. *Rev Immunogenet*, 2 (2):220-230.
- Jay PR, Centrella M, Lorenzo J, Bruce AG, Horowitz MC. 1996. Oncostatin-M: a new bone active cytokine that activates osteoblasts and inhibits bone resorption. *Endocrinology*, 137 (4):1151-1158.
- Jokhi PP, King A, Jubinsky PT, Loke YW. 1994. Demonstration of the low affinity alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSF-R alpha) on human trophoblast and uterine cells. *J Reprod Immunol*, 26 (2):147-164.
- Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P, et al. 1995. Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem*, 270 (25):15250-15256.
- Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A. 1999. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J*, 18 (8):2127-2136.
- Kanzaki H, Crainie M, Lin H, Yui J, Guilbert LJ, Mori T, Wegmann TG. 1991. The in situ expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mRNA at the maternal-fetal interface. *Growth Factors*, 5 (1):69-74.
- Ko HS, Kang HK, Kim HS, Choi SK, Park IY, Shin JC. 2012. The effects of oncostatin M on trophoblast cells: Influence on matrix metalloproteinases-2 and -9, and invasion

- activity. Placenta,
- Kowalewska M, Danska-Bidzinska A, Bakula-Zalewska E, Bidzinski M. 2012. Identification of suitable reference genes for gene expression measurement in uterine sarcoma and carcinosarcoma tumors. *Clin Biochem*, 45 (4-5):368-371.
- Krause S. 2011. Zellbiologische und Signaltransduktions-Analysen hinsichtlich des Invasionsverhaltens der trophoblastären Zelllinien HTR-8 und JAR in Abhängigkeit der Zytokine G-CSF und GM-CSF [Bachelor of Science]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C. 2005. Vital functions for lethal caspases. *Oncogene*, 24 (33):5137-5148.
- Liu B, Gross M, ten Hoeve J, Shuai K. 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (6):3203-3207.
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (18):10626-10631.
- Löffler G. 1999. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 3te Aufl. Berlin: Springer.
- Loke YW, King A, Gardner L, Carter NP. 1992. Evidence for the expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors by human first trimester extravillous trophoblast and its response to this cytokine. *J Reprod Immunol*, 22 (1):33-45.
- Lopata A, Bentin-Ley U, Enders A. 2002. "Pinopodes" and implantation. *Rev Endocr Metab Disord*, 3 (2):77-86.
- Luchsinger C, Arias ME, Vargas T, Paredes M, Sanchez R, Felmer R. 2013. Stability of reference genes for normalization of reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) data in bovine blastocysts produced by IVF, ICSI and SCNT. *Zygote*:1-8.
- Malone DG, Pierce JH, Falko JP, Metcalfe DD. 1988. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by primary cultures of unstimulated rat microvascular endothelial cells. *Blood*, 71 (3):684-689.
- Marino VJ, Roguin LP. 2008. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *J Cell Biochem*, 103 (5):1512-1523.
- Martinez-Moczygemba M, Huston DP. 2003. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol*, 112 (4):653-665; quiz 666.
- McEwan M, Lins RJ, Munro SK, Vincent ZL, Ponnampalam AP, Mitchell MD. 2009. Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20 (3):241-249.
- Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, Leonard WJ. 1995. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 269 (5220):79-81.
- Moore KL, Persaud, T. V. N. 2007. Embryologie. 5te Aufl. München: Elsevier.
- Morales-Prieto DM, Schleussner E, Markert UR. 2011. Reduction in miR-141 is induced by leukemia inhibitory factor and inhibits proliferation in choriocarcinoma cell line JEG-3. *Am J Reprod Immunol*, 66 Suppl 1:57-62.
- Morikawa Y. 2005. Oncostatin M in the development of the nervous system. *Anat Sci Int*, 80 (1):53-59.
- Morrish DW, Dakour J, Li H. 1998. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*, 39 (1-2):179-195.

- Murray MJ, Lessey BA. 1999. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol*, 17 (3):275-290.
- Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A. 1996. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: a potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab*, 81 (2):801-806.
- Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. 1997. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387 (6636):924-929.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. 2000. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem*, 275 (13):9095-9098.
- Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA. 1999. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J*, 18 (2):375-385.
- Nickles D, Falschlehner C, Metzger M, Boutros M. 2012. A genome-wide RNA interference screen identifies caspase 4 as a factor required for tumor necrosis factor alpha signaling. *Mol Cell Biol*, 32 (17):3372-3381.
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. 1992. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*, 267 (6):3581-3584.
- Ooi J, Tojo A, Asano S, Sato Y, Oka Y. 1998. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of a common beta subunit of GM-CSF receptor and its association with Stat5 in TF-1/TPO cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 246 (1):132-136.
- Opdenakker G, Masure S, Grillet B, Van Damme J. 1991. Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res*, 10 (4):317-324.
- Paradis H, Gendron RL. 2000. LIF transduces contradictory signals on capillary outgrowth through induction of stat3 and (P41/43)MAP kinase. *J Cell Sci*, 113 Pt 23:4331-4339.
- Park LS, Friend D, Gillis S, Urdal DL. 1986. Characterization of the cell surface receptor for human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 164 (1):251-262.
- Pastuschek J. 2012. Analysis of granulosa cells by single cell PCR [Master of Science]. Jena: University Hospital Jena, Germany.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30 (9):e36.
- Pluznik DH, Bickel M, Mergenhagen SE. 1989. B lymphocyte derived hematopoietic growth factors. *Immunol Invest*, 18 (1-4):103-116.
- Prakash GJ, Suman P, Morales Prieto DM, Markert UR, Gupta SK. 2011. Leukaemia inhibitory factor mediated proliferation of HTR-8/SVneo trophoblast cells is dependent on activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *Reprod Fertil Dev*, 23 (5):714-724.
- Radtke S, Hermanns HM, Haan C, Schmitz-Van De Leur H, Gascan H, Heinrich PC, Behrmann I. 2002. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J Biol Chem*, 277 (13):11297-11305.
- Ram PA, Waxman DJ. 2000. Role of the cytokine-inducible SH2 protein CIS in desensitization of STAT5b signaling by continuous growth hormone. *J Biol Chem*, 275 (50):39487-39496.

- Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ. 2001. Mouse models of cell death. *Nat Genet*, 28 (2):113-118.
- Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. 1992. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod*, 46 (6):1069-1079.
- Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. 1999. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod*, 60 (2):251-261.
- Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, Guillet C, Auguste P, Pouplard-Barthelaix A, Pennica D, Gascan H. 1997. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem*, 272 (8):4855-4863.
- Rose TM, Weiford DM, Gunderson NL, Bruce AG. 1994. Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine*, 6 (1):48-54.
- Sawai K, Azuma C, Koyama M, Ito S, Hashimoto K, Kimura T, Samejima Y, Nobunaga T, Saji F. 1995. Leukemia inhibitory factor (LIF) enhances trophoblast differentiation mediated by human chorionic gonadotropin (hCG). *Biochem Biophys Res Commun*, 211 (1):137-143.
- Schonbeck U, Mach F, Libby P. 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 161 (7):3340-3346.
- Schrell UM, Koch HU, Marschalek R, Schrauzer T, Anders M, Adams E, Fahlbusch R. 1998. Formation of autocrine loops in human cerebral meningioma tissue by leukemia inhibitor factor, interleukin-6, and oncostatin M: inhibition of meningioma cell growth in vitro by recombinant oncostatin M. *J Neurosurg*, 88 (3):541-548.
- Shapiro S, Khodalev O, Bitterman H, Auslender R, Lahat N. 2010. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298 (4):C942-951.
- Sjoblom C, Wikland M, Robertson SA. 1999. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod*, 14 (12):3069-3076.
- Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer HD. 2012. Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol*, 188 (4):1992-2000.
- Sopata I, Danciewicz AM. 1974. Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta*, 370 (2):510-523.
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, 263 (5143):92-95.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359 (6390):76-79.
- Suman P, Shembekar N, Gupta SK. 2013. Leukemia inhibitory factor increases the invasiveness of trophoblastic cells through integrated increase in the expression of adhesion molecules and pappalysin 1 with a concomitant decrease in the expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *Fertil Steril*, 99 (2):533-542 e532.
- Takahashi Y, Carpino N, Cross JC, Torres M, Parganas E, Ihle JN. 2003. SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *EMBO J*, 22 (3):372-384.

- Takahashi Y, Takahashi M, Carpino N, Jou ST, Chao JR, Tanaka S, Shigeyoshi Y, Parganas E, Ihle JN. 2008. Leukemia inhibitory factor regulates trophoblast giant cell differentiation via Janus kinase 1-signal transducer and activator of transcription 3-suppressor of cytokine signaling 3 pathway. *Mol Endocrinol*, 22 (7):1673-1681.
- Takashima S, Klagsbrun M. 1996. Inhibition of endothelial cell growth by macrophage-like U-937 cell-derived oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and transforming growth factor beta1. *J Biol Chem*, 271 (40):24901-24906.
- Tapia A, Salamonsen LA, Manuelpillai U, Dimitriadis E. 2008. Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum Reprod*, 23 (8):1724-1732.
- Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. 1984a. Characterization of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic cells purified from conditioned medium of mouse Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett*, 178 (2):291-296.
- Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. 1984b. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem*, 259 (17):10978-10982.
- Ungureanu D, Vanhatupa S, Kotaja N, Yang J, Aittomaki S, Janne OA, Palvimo JJ, Silvennoinen O. 2003. PIAS proteins promote SUMO-1 conjugation to STAT1. *Blood*, 102 (9):3311-3313.
- Wahl AF, Wallace PM. 2001. Oncostatin M in the anti-inflammatory response. *Ann Rheum Dis*, 60 Suppl 3:iii75-80.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A. 2000. The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*, 95 (1):19-29.
- Watanabe S, Itoh T, Arai K. 1996. Roles of JAK kinases in human GM-CSF receptor signal transduction. *J Allergy Clin Immunol*, 98 (6 Pt 2):S183-191.
- Wegmann TG, Guilbert LJ. 1992. Immune signalling at the maternal-fetal interface and trophoblast differentiation. *Dev Comp Immunol*, 16 (6):425-430.
- Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. 1986. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (24):9739-9743.
- Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, Moritz RL, Cary D, Richardson R, Hausmann G, Kile BJ, Kent SB, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. 1999. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (5):2071-2076.

9 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle sind hier die Mitarbeiter des Plazentalabors zu nennen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Udo Markert für die freundliche Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl.-biol. Jana Pastushek und Herrn Dr. rer. nat. Sebastian Hölter. Sie haben mir stets in allen praktischen Belangen der Laborarbeit zu helfen gewusst und mich auch in theoretischen Fragen sowie beim Verfassen der Dissertation mit großem Einsatz unterstützt. Ohne sie wäre diese Dissertation mit Sicherheit nicht zu dem vorliegenden Ergebnis gekommen.

Aber auch allen anderen Mitarbeitern des Plazentalabors sowie des molekularbiologischen Labors der Gynäkologie möchte ich für die Hilfsbereitschaft und stets angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Hervorzuheben sind unter ihnen Dr. Norman Häfner und Martina Schmitz, die mir freundlicherweise einige Primersequenzen zur Verfügung stellten. Meiner Familie danke ich für die viele Motivation, Zeit und Kraft, die mir täglich geschenkt wurde.

Lebenslauf**Persönliche Angaben**

Name: Juliane Beckus
Geburtsdatum: 12. Mai 1989
Geburtsort: Reichenbach (Vogtland)
Geburtsname: Neubauer
Anschrift: Löbstedter Straße 9, 07749 Jena
eMail: juliane.beckus@web.de

Ausbildung

1999 bis 2007 Gymnasium Haus Overbach, Jülich-Barmen
- Juni 2007: Abitur (Note 1,4)
2007 bis 2013 Studium der Humanmedizin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- September 2009: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
- Oktober 2013: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,3)
- November 2013: Approbation

Praktika

2007 Pflegepraktikum im Malteser-Krankenhaus Jülich
2010 Famulaturen im Universitätsklinikum Jena
- Klinik für Innere Medizin (Kardiologie)
- Klinik für Kinder- und Jugendmedizin (Neonatologie)
2012 Famulatur in einer Gemeinschaftspraxis für Kinder- und Jugendmedizin in Jena
2012 bis 2013 Praktisches Jahr
- Chirurgie: Thüringenkliniken Saalfeld
- Pädiatrie: Helios-Klinikum Erfurt
- Innere Medizin: Klinikum Burgenlandkreis Naumburg

Weiterbildung und Beschäftigung

2013 bis 2016	Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin Klinikum Burgenlandkreis Naumburg
ab März 2016	Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin Klinikum Bayreuth

Jena, den 17.2.2016

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,
dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Udo Markert

Dipl.-biol. Jana Pastuschek

Dr. rer. nat. Sebastian Hölters

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe
und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 17.2.2016